

**Strukturelle und funktionelle Analyse von
drei Gruppen von Kunitz Typ Enzyminhibitoren
aus Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum* L.)**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

Vorgelegt von
Andreas Heibges
aus Würselen

Köln 2001

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Christiane Gebhardt
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Invertase im Kohlenhydratstoffwechsel und der Prozess des "Süßwerdens"	1
1.2 Invertase-Inhibitor	2
1.3 Kunitz Typ Inhibitorproteine in Kartoffelknollen	5
1.4 Ziele der Arbeit	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	8
2.1.2 Bakterien- und Hefestämme	8
2.1.3 Vektoren	9
2.1.4 Häufig verwendete Medien und Puffer	9
2.2 Methoden	11
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA und BAC-DNA aus <i>E. coli</i>	11
2.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	12
2.2.3 Sequenzierung von DNA	12
2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	12
2.2.5 Klonierung in pESP2	14
2.2.6 Klonierung in pREP3X	14
2.2.7 Transformation von <i>E. coli</i>	14
2.2.7.1 Hitzeschocktransformation	14
2.2.7.2 Elektroporation	15
2.2.8 Transformation von <i>S. pombe</i>	15
2.2.9 Überprüfung transformierter Klone	15
2.2.10 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	15
2.2.11 Analyse von mit Restriktionsenzymen verdauter BAC-DNA	16

2.2.11.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten auf denaturierenden Polyacrylamidgelen	16
2.2.11.2 Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen	16
2.2.11.3 Southern Blot	16
2.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration	17
2.2.13 Elektrophoretische Trennung von Proteinen	17
2.2.14 Färbung von Proteinen	18
2.2.15 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Semidry-Blotting)	18
2.2.16 Immunodetektion von Proteinen	18
2.2.17 Induktion der Proteinexpression	19
2.2.18 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Hefe	20
2.2.18.1 Aufreinigung von Fusionsproteinen mit GST-Tag	20
2.2.18.2 Native Aufreinigung von Fusionsproteinen mit His-Tag	21
2.2.18.3 Denaturierende Aufreinigung von Fusionsproteinen mit His-Tag	21
2.2.19 Renaturierung von Fusionsproteinen mit His-Tag	22
2.2.20 Spaltung von GST-Fusionsproteinen mit Enterokinase	22
2.2.21 Präparation von Invertase aus <i>S. tuberosum</i>	23
2.2.21.1 Herstellung von Kartoffelsaft	23
2.2.21.2 Aufreinigung von Kartoffelinvertase	23
2.2.22 Bestimmung inhibitorischer Aktivität von Proteinen	24
2.2.22.1 Relative Invertaseaktivität	24
2.2.22.2 Relative Proteaseaktivität	25
2.2.23 Transgene Kartoffelpflanzen	27
2.2.23.1 Expressionskonstrukte	27
2.2.23.2 Gewinnung von DNA aus Kartoffelblättern	28
2.2.24 Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern aus Kartoffelknollen	28
2.2.24.1 Herstellung von Zuckerauszügen	28
2.2.24.2 Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern	29
2.2.25 Versuche zur Inhibierung mikrobieller Pilze durch Inhibitorproteine	29
2.2.25.1 Versuch zur Inhibierung von <i>Phytophthora infestans</i>	29
2.2.25.2 Inhibierung des Wachstums mikrobieller Pilze in Mikrotiterplattentest	30
2.2.26 Computeranalyse	30

2.2.27 Sonstiges	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Charakterisierung von Kunitz Typ Inhibitorclonen aus <i>S. tuberosum</i>	32
3.1.1 Sequenzanalyse von Inhibitoren aus Knollen von <i>S. tuberosum</i>	32
3.1.2 Homologie der Inhibitorgruppen	38
3.1.3 Auswahl der Inhibitorproteine zur funktionellen Analyse	40
3.1.4 Sequenzmotive	40
3.1.5 Invertase-Inhibitorklone	42
3.1.6 Biochemische Merkmale der Inhibitorproteine	43
3.2 Expression und Aufreinigung von Inhibitorproteinen in einem heterologen System	45
3.2.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>S. pombe</i>	45
3.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie	47
3.2.3 Spaltung von GST-Fusionsproteinen durch Enterokinase	49
3.2.4 Expression von His-Tag Fusionsproteinen in <i>S. pombe</i>	50
3.2.5 Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie	51
3.2.6 Renaturierung von Fusionsproteinen mit His-Tag	53
3.3 Funktionelle Analyse rekombinanter Inhibitorproteine	54
3.3.1 Inhibierung von Invertase	54
3.3.2 Inhibierung von Proteasen durch GST-Fusionsproteine	55
3.3.3 Vergleich von GST-P1H5.B und P1H5.B	60
3.3.4 Bestimmung einer Inhibitorkonstante	61
3.3.5 Inhibierung des Wachstums mikrob. Pilze durch Proteaseinhibitor-Fusionsproteine	62
3.3.6 Expression der Inhibitorklone 1421 und 1422 in transgenen Kartoffelpflanzen	65
3.4 Immunodetektion der Inhibitor-Fusionsproteine mit polyklonalen Antiseren	67
3.5 Organisation der Inhibitorgene im Kartoffelgenom	69
3.5.1 Screening einer BAC-Bibliothek mit Inhibitor DNA-Sonden	69
3.5.2 Analyse von mit <i>HindIII</i> und <i>TaqI</i> verdauter DNA	70
3.5.3 Vergleich der 5'-nichttranslatierten DNA-Sequenzen der Inhibitorklone	73

4. Diskussion	76
4.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Inhibitorgruppen	76
4.1.1 Charakterisierung von Kunitz Typ Inhibitorklonen aus <i>S. tuberosum</i>	76
4.1.2 Invertase-Inhibitorklone	78
4.2 Funktionelle Analyse von Kunitz Typ Inhibitoren	81
4.2.1 Heterologe Expression von Kunitz Typ Inhibitor-Fusionsproteinen in <i>S. pombe</i>	81
4.2.2 Inhibierung von Kartoffelinvertase	81
4.2.3 Inhibierung von Proteasen	83
4.2.4 Inhibierung des Mycelwachstums mikrobieller Pilze	86
4.2.5 Expression der Inhibitorklone 1421 und 1422 in transgenen Kartoffelpflanzen	89
4.3 Organisation der Inhibitorgene im Kartoffelgenom	90
4.4 Ausblick	95
5. Zusammenfassung	97
6. Abstract	99
7. Literaturverzeichnis	101
8. Verzeichnis der Abkürzungen	118

1. Einleitung

Die Kulturkartoffel *Solanum tuberosum* entwickelte sich seit ihrer Einfuhr in Europa zu einer der wichtigsten Nutzpflanzen. Sie gehört zur formenreichen und ökonomisch sehr bedeutsamen Familie der *Solanaceae*, zu der auch weitere wichtige Nutzpflanzen wie Tomaten (*Lycopersicon esculentum*), Paprika (*Capsicum annuum*), Auberginen (*S. melongena*), Tabak (*Nicotiana tabacum*) sowie Zierpflanzen wie die Petunie (*Petunia hybrida*) und die Engelstropete (*Datura stramonium*) zählen. Einheimische Arten dieser Familie sind z.B. das Bittersüß (*S. dulcamara*) sowie die wegen ihrer Tropan-Alkaloide pharmazeutisch wichtige Tollkirsche (*Atropa bella-donna*).

Die Kartoffel stellt aufgrund ihrer Eigenschaften als Lieferant hochwertiger Eiweiße, die eine große ernährungsphysiologische Bedeutung besitzen, sowie als Stärkelieferant einen bedeutsamen Faktor in der menschlichen Ernährung dar. In der kartoffelverarbeitenden Industrie findet sie vorwiegend bei der Stärkegewinnung sowie in der Nahrungsmittelherstellung Verwendung. Bei Letzterer hat vor allem die Herstellung von Frittierprodukten eine große ökonomische Bedeutung. Sowohl der Gehalt an hochwertigem Eiweiß als auch der Anteil von Stärke und reduzierenden Zuckern bestimmen somit die Qualität der Kartoffel.

1.1 Invertase im Kohlenhydratstoffwechsel und der Prozess des “Süßwerdens”

Kartoffelknollen sind Lieferanten hochwertiger Eiweiße und Vitamine sowie eine wichtige Kohlenhydratquelle. Als Speicherorgane der Kartoffelpflanze verfügen sie über eine Reihe von Enzymen, welche bestimmte biochemische Prozesse wie die Synthese von Stärke oder den Abbau der Stärke zu Saccharose und reduzierenden Zuckern katalysieren, etwa α -Amylase, Invertase und Saccharose-Synthase (Prat *et al.*, 1990, Schwall *et al.*, 2000).

Geerntete Knollen müssen bis zu ihrer Weiterverarbeitung, beispielsweise zu Frittierprodukten, gelagert werden. Zur Verhinderung der Keimung werden Keimhemmungsmittel eingesetzt in Kombination mit einer Lagerung bei niedriger Temperatur. Die kalte Lagerung der Knollen führt dabei zur Akkumulation von Hexosen. Dieser Prozess des “Süßwerdens” ist seit langem bekannt und wurde bereits häufig beschrieben (Müller-Thurgau, 1882, Schwimmer

et al., 1961, Pressey und Shaw, 1966, Burton, 1969, Ohad *et al.*, 1971, Isherwood, 1973, Samotus *et al.*, 1974, Ewing 1981). Eine unbekannte Anzahl genetischer Faktoren und Umweltfaktoren verursachen diesen Anstieg an reduzierenden Zuckern. Ein biochemischer Vorgang ist die durch Kälte induzierte Zunahme der Invertaseaktivität, welche eine verstärkte Hydrolyse von Saccharose zur Folge hat. Des weiteren zeigt die Amyloplastenmembran bei niedrigen Temperaturen eine höhere Permeabilität, was zur Freisetzung degenerativer Enzyme und Intermediate führen kann (Ohad *et al.*, 1971). Schließlich werden Saccharose und reduzierende Zucker durch eine Reduktion der Glykolyse akkumuliert (Pollock und apRees, 1975, Dixon *et al.*, 1981, Hammond *et al.*, 1990), da Schlüsselenzyme der Glykolyse wie Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase kälteempfindlich sind. Pressey (1970) zeigte, dass die Saccharose-Synthaseaktivität nach der Knollenernte abnimmt. Die Invertaseaktivität in Knollen, die drei Wochen lang bei 4°C gelagert wurden, ist um ein Vierfaches höher als bei Kartoffeln, die bei 20°C aufbewahrt wurden (Sasaki *et al.*, 1971, Zrenner *et al.*, 1996). Nach Kaltlagerung ist zudem ein zehnmal höherer Zuckergehalt festzustellen, wobei der Anteil von Glucose und Fructose den von Saccharose übersteigt. Das Verhältnis von Glucose zu Fructose beträgt dabei 1 : 1, was auf eine Hydrolyse durch Invertase hindeutet.

Es gibt zwei verschiedene Typen von Invertasen: saure Invertasen sind in der Vakuole und im Apoplast lokalisiert und haben ein Aktivitätsmaximum bei pH 4,5 – 5,0. Das pH-Optimum der basischen Invertasen, welche sich im Cytoplasma befinden, liegt dagegen bei 7,5 (Krishnan und Pueppke, 1990, Frommer und Sonnewald, 1995, Sturm *et al.*, 1995, Greiner *et al.*, 1998, Krausgrill *et al.*, 1998).

1.2 Invertase-Inhibitor

In Kartoffelknollen regulieren unterschiedliche Mechanismen und Faktoren, die in den Kohlenhydratstoffwechsel eingreifen, die Stärke auf- und abbauenden metabolischen Prozesse. Eine zentrale Rolle spielt dabei Invertase, welche Saccharose in die reduzierenden Zucker Glucose und Fructose spaltet. Der Aktivität der Invertase wirkt ein Invertase-Inhibitor entgegen, welcher erstmals von Schwimmer (1961) aufgrund des variablen Aktivitätsverhaltens der Invertase postuliert und dessen Vorhandensein durch eine partielle Aufreinigung des

Proteins durch Pressey (1966) bestätigt wurde. Weiterhin wurde der Invertase-Inhibitor aus Kartoffelknollen als ein 17 kD großes Protein charakterisiert, welches die Invertasen anderer Pflanzenarten, nicht aber die von Hefezellen und *Neurospora* hemmt (Pressey und Shaw, 1966, Pressey 1967). Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt zwischen 4,0 und 4,6. Ewing und McAdoo (1971) zeigten, dass es sich um einen nicht-kompetitiven Inhibitor handelt, welcher nach einer langsamen Komplexbildung irreversibel an Invertase bindet.

Die messbaren Aktivitäten der Invertase und ihres Inhibitors sind temperaturabhängig. Frisch geerntete Kartoffeln zeigen eine hohe Invertase-Inhibitoraktivität und eine geringe Invertaseaktivität bei einem niedrigen Gehalt an reduzierenden Zuckern. Werden die Kartoffelknollen in der Kälte gelagert, steigt die Invertaseaktivität bei abnehmender Inhibitoraktivität an, so dass der Anteil an reduzierenden Zuckern steigt. Dieser Prozess des “Süßwerdens” (“sweetening”) ist reversibel. Werden die Knollen einige Wochen bei Temperaturen von 18 – 20°C gelagert, nimmt der Gehalt an reduzierenden Zuckern wieder ab und der Stärkeanteil steigt, bis die Ausgangssituation bezüglich der Invertase- und Inhibitoraktivität wiederhergestellt ist (Pressey, 1967, 1970).

Invertase-Inhibitoren wurden auch in Zuckerrüben (*Beta vulgaris*), der roten Rübe (*Beta vulgaris* var. *conditiva*), der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) und im Endosperm von Mais (*Zea mays*) nachgewiesen (Pressey, 1968, Jaynes und Nelson 1971). Zuckerrübe und rote Rübe weisen dabei ebenfalls Invertase-Inhibitoren mit einem Aktivitätsmaximum bei pH 4,5 und einem sich langsam bildenden und dann nicht dissoziierbaren Enzym-Inhibitor-Komplex auf. Der Invertase-Inhibitor der Süßkartoffel ist ein 19,5 kD großes Protein mit einem Aktivitätsmaximum bei pH 5,0 und einem sich schnell bildenden, reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex. Alle genannten Invertase-Inhibitoren hemmen ausschließlich saure Invertasen und inhibieren auch artfremde saure Invertasen (Bracho und Whitaker, 1990), mit Ausnahme der Invertase aus Süßkartoffelblättern, welche nur durch den Invertase-Inhibitor der Süßkartoffel gehemmt wird (Pressey, 1968).

Die bei Kaltlagerung einsetzende Zunahme des Gehaltes an reduzierenden Zuckern bedeutet eine Qualitätseinbuße bei der Verarbeitung zu Frittierprodukten. Die reduzierenden Zucker gehen bei hohen Temperaturen eine Maillard-Reaktion (“nichtenzymatische Bräunung”) mit freien Aminosäuren in der Knolle ein (Maillard, 1912). Die dabei entstehenden braunen, bitter schmeckenden Endprodukte (Amadori-Produkte) stehen im Verdacht, kanzerogen zu wirken.

Je mehr reduzierende Zucker die Kartoffel enthält, desto mehr Aminosäuren gehen in eine Maillard-Reaktion ein, das Produkt wird folglich bitterer im Geschmack und dunkler (Putz, 1991). Um eine Akkumulation von reduzierenden Zuckern zu vermeiden, lagert die Kartoffelveredlungsindustrie die Knollen bei Temperaturen von 8 – 10°C. Bei diesen Temperaturen ist der Einsatz von Keimhemmungsmitteln notwendig, um eine Keimung und die dadurch bedingten nachteiligen Veränderungen des Stärke- und Wassergehaltes zu verhindern. Aufgrund erhöhter Aufwendungen für die erforderliche Rekonditionierung der Kartoffeln vor der Verarbeitung und des Bestrebens zur Vermeidung des Einsatzes von Keimhemmungsmitteln ist das Interesse an Kartoffeln mit verbesserter Kaltlagerfähigkeit gestiegen. Diese sollen sich direkt nach der Lagerung bei niedrigen Temperaturen verarbeiten lassen. Da derzeitige Sorten eine solche Kaltlagerfähigkeit nicht aufweisen wird versucht, auf züchterischem oder molekulargenetischem Weg eine derartige neue Sorte herzustellen. Ein molekularbiologischer Ansatz hierzu ist die Überexpression des Invertase-Inhibitors in kältegelagerten Kartoffelknollen, welche die Bildung reduzierender Zucker durch Invertase unterdrückt. Notwendig ist hierzu die nähere Charakterisierung des Invertase-Inhibitors und das Studium seiner Regulation und seines Expressionsverhaltens. Die proteinbiochemischen Arbeiten, welche die Isolierung des Proteins aus Kartoffelknollen, funktionelle Tests sowie die Gewinnung von Antikörpern umfassten, wurden von Dr. Ch. Gebhardt, Dr. M. Köster-Töpfer und Dr. H. Glaczinski durchgeführt (unveröffentlichte Daten). Kandidaten-cDNAs für das Invertase-Inhibitorgen wurden von Dr. H. Glaczinski aufgrund partieller N-terminaler Sequenzierungen der Aminosäuresequenz des Inhibitors kloniert und auf Nukleinsäureebene charakterisiert. Die N-terminale Peptidsequenz identifizierte den Kartoffelinvertase-Inhibitor als Vertreter der Kunitz Typ Inhibitorfamilie. Es wurden Expressionskonstrukte der Kandidatengene mit einem kalte-induzierbaren Promotor (Schneider *et al.*, 1997) erstellt, mit denen Kartoffelpflanzen transformiert wurden. Die Resultate dieser Arbeiten stellten die Grundlage für die vorliegende Arbeit dar und sind an entsprechenden Stellen des Ergebnisteils kurz dargestellt.

1.3 Kunitz Typ Inhibitorproteine in Kartoffelknollen

Den Hauptbestandteil an Protein in Kartoffelknollen bilden neben dem Speicherprotein Patatin, welches bis zu 40 % des gelösten Proteins ausmacht (Bohac, 1991, Strickland *et al.*, 1995), Inhibitorproteine. Diese Proteine, welche in den Speicherorganen und Samen vieler Pflanzenarten zu finden sind, können der Pflanze Resistenz gegen Krankheiten, Pathogene oder Insekten verleihen oder fungieren als Enzyminhibitoren.

Die ersten Enzyminhibitoren wurden in den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts aus Sojabohnensamen isoliert. Dabei handelte es sich um Kunitz Typ sowie Bowman-Birk Typ Proteaseinhibitoren (Kunitz, 1945, Bowman, 1946). Aus Getreidekörnern wurde ebenfalls in diesem Zeitraum ein Inhibitor von α -Amylase isoliert (Kneen und Sandstedt, 1943). Seit dieser Zeit wurden zahlreiche weitere Inhibitoren isoliert und charakterisiert, die meisten aus Samen und Speicherorganen. Der weitaus größte Teil der bislang charakterisierten Inhibitoren hemmt Endoproteasen, eine kleinere Anzahl auch Amylasen. Des weiteren sind bifunktionale Inhibitoren bekannt, welche zum Beispiel Proteasen und Amylasen hemmen (Shewry, 1999). Über die Hemmung anderer Enzyme durch derartige Inhibitoren existieren derzeit nur wenige Studien. Beispiele für andere Zielenzyme von Inhibitoren in Samen und Speicherorganen sind eine Katalase im Scutellum von Mais (Tsaftaris *et al.*, 1980), eine Urease in Melonen (Makkar *et al.*, 1980) sowie Lipasen in mehreren Arten, beispielsweise Sonnenblumen, Sojabohnen und Getreide (Lairon *et al.*, 1985, Chapman, 1987, Garouri *et al.*, 1984, Wang und Huang, 1984, Huang und Wang, 1992). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Enzyminhibitoren erlaubt eine Einteilung in derzeit zwölf verschiedene Familien sowie vier α -Amylase Inhibitoren, welche möglicherweise eigene Familien repräsentieren (Richardson, 1991, Yang *et al.*, 1992, Menegatti *et al.*, 1992, Brandt *et al.*, 1990, Rosenkrands *et al.*, 1994). Die wichtigsten Familien sind neben den bereits erwähnten Kunitz Typ und Bowman-Birk Typ Inhibitoren die Kartoffelinhibitoren der Typen I und II, Squash Inhibitoren, Carboxypeptidase Inhibitoren sowie Cystatine.

Kunitz Typ Inhibitoren sind eine der am weitesten verbreiteten Familien. Sie sind hauptsächlich in Samen von Leguminosen, aber auch in anderen Pflanzenarten und in Organen wie Getreidekörnern oder Kartoffelknollen zu finden. Ein "typischer" Vertreter ist der Trypsininhibitor aus Sojabohnen mit einem relativen Molekulargewicht von 21.000 und vier

Cysteinresten, welche zwei intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Nicht alle Kunitz Typ Inhibitoren sind Proteaseinhibitoren. In den Samen von *Psophocarpus tetragonolobus* ist mit einem Anteil von mehr als 15 % ein Speicherprotein mit einer Sequenzähnlichkeit zum Trypsininhibitor aus Sojabohnen von 38 % zu finden, bei dem bislang keine enzymhemmenden Eigenschaften festgestellt werden konnten (Kortt *et al.*, 1989). Ebenfalls zu dieser Inhibitorfamilie gehören bifunktionale Inhibitoren von α -Amylase und Subtilisin. Ein gut charakterisierter Vertreter dieser Gruppe ist ein Protein aus Gerste mit einem relativen Molekulargewicht von 19.865 (Svendsen *et al.*, 1986). Dieses hemmt α -Amylase 2 aus Gerste in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2 : 1 (Halayko *et al.*, 1986) und Subtilisin in einem Verhältnis von 1 : 1 (Yoshikawa *et al.*, 1979). Die verschiedenen inhibitorischen Aktivitäten scheinen in unterschiedlichen Regionen des Proteins lokalisiert zu sein. Ähnliche Inhibitoren sind auch in Weizen, Reis und Roggen zu finden (Weselake *et al.*, 1985).

Während des Wachstums von Kartoffelknollen, welche durch primäres Dickenwachstum mehrerer Internodien am Ende von Stolonen unterirdisch, plagiotrop wachsenden Seitensprossen entstehen, kommt es hier zur Synthese einer Reihe von charakteristischen Proteinen. Neben Patatin sind dies in den Stärkehaushalt involvierte Enzyme (Rocha-Sosa *et al.*, 1989, Wenzler *et al.*, 1989) sowie Proteine, welche auch in anderen Organen der Pflanze zu finden sind, in den Knollen jedoch in hoher Konzentration vorliegen. Dazu gehören die wundinduzierbaren Proteaseinhibitoren I und II (Ryan, 1990, Thornburg *et al.*, 1987, Peña-Cortes *et al.*, 1988) sowie ein umfangreicher Satz von Kunitz Typ Enzyminhibitoren. Aufgrund bereits charakterisierter Eigenschaften einiger Vertreter als Enzyminhibitoren (Ishikawa *et al.*, 1994) oder Abwehr gegen Fraßinsekten (Boulter, 1993) ist eine umfangreiche, vergleichende Analyse dieser Proteinfamilie von Interesse. Grundlage für die in dieser Arbeit vorgenommen molekulargenetischen und biochemischen Untersuchungen an Kunitz Typ Inhibitoren aus Kartoffelknollen ist eine EST-Bibliothek (Dr. A. Ballvora, unveröffentlichte Daten), aus welcher entsprechende Inhibitorklone iso-liert wurden.

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Kartoffelpflanzen, die mit einem Expressionskonstrukt aus einem kälteinduzierbaren Promotor und Kandidaten für das Invertase-Inhibitorgen transformiert waren, biochemisch und molekulargenetisch charakterisiert werden und ihre Verwendbarkeit als kaltlagerfähige Sorte überprüft werden. Desweiteren sollte die biologische Aktivität der Kandidaten für das Invertase-Inhibitorgen durch Expression in einem heterologen System, Aufreinigung der Proteine und anschließende Aktivitätstests überprüft werden.

Parallel hierzu sollte die Familie der Kunitz Typ Enzyminhibitoren in Kartoffelknollen, zu der die Kandidaten für das Invertase-Inhibitorgen gehören, biochemisch und molekulargenetisch untersucht werden. Grundlage hierfür waren Klone aus einer EST-Bibliothek. Durch Expression in einem heterologen System sollten die biologischen Aktivitäten einiger Vertreter charakterisiert und verglichen werden. Des weiteren sollten Untersuchungen zur Organisation der Inhibitorgene im Kartoffelgenom durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt wurden Chemikalien des Reinheitsgrades p.a. der Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet. Nährmedienzusätze stammten von den Firmen Stratagene (Amsterdam / Niederlande) sowie DIFCO (Detroit, USA). Restriktionsendonukleasen und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von Roche (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt a. M.), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen. Andere Enzyme wurden von Sigma-Aldrich und Fluka bezogen. ^{32}P markierte Radioisotope wurden von Amersham Pharmacia Biotech geliefert. Oligonukleotide stammten von der Firma Gibco BRL.

Desweiteren wurden folgende Kits verwendet: Plasmid Midi Kit, Qiaquick Spin PCR Purification Kit, Qiaex Gel Extraction Kit (alle Qiagen, Hilden), ESP™ LIC Cloning Kit (Stratagene), Recombinant Enterokinase Kit (Novagen, Cambridge / USA), ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech), D-Glucose / D-Fructose UV-Test (Roche).

Folgende Gelmatrices zur chromatographischen Auftrennung und Reinigung von Proteinen wurden eingesetzt: GST Affinity Resin (Stratagene), Ni-NTA Superflow (Qiagen), Con-A Sepharose 4B (Fluka).

2.1.2 Bakterien- und Hefestämme

E. coli DH5 α (Hanahan 1983)

F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*,
hsdR17(r_k⁻, m_k⁻), *supE44*, *relA1*, *deoR*,
 Δ (lacZYA-argF) U169

<i>E. coli</i> DH10B (Dower <i>et al.</i> , 1988)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG</i>
Epicurian coli® XL 10-Gold™ (Stratagene)	Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI</i> ^q ZΔM15Tn10(Tet ^r)AmyCam ^r] ^a
<i>S. pombe</i> SP-Q01 (Stratagene)	<i>h⁻ leu1-32</i>

2.1.3 Vektoren

pBluescript II SK+/-	(Stratagene, Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992)
pESP2	(Stratagene, Lu <i>et al.</i> , 1997)
pREP3X	(ATCC, Maundrell, 1993)

2.1.4 Häufig verwendete Medien und Puffer

EMM	32 g/L Edingburgh Minimal Medium (Stratagene, Amsterdam / Niederlande), bei festen Medien 20 g/L Agar
EMM _{Thi}	EMM-Medium mit 25 μM Thiamin
LB	10 g/L Trypton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt pH 7,5 (NaOH), bei festen Medien 20 g/L Agar
LB _{Amp}	LB-Medium mit 60 μg/mL Ampicillin

LB _{Tet}	LB-Medium mit 15 µg/mL Tetracyclin
NZY ⁺	5 g/L NaCl 2 g/L MgSO ₄ · H ₂ O 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Caseinhydrolysat (NZ Amine) pH 7,5 (NaOH)
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PBST	1%[v/v] TritonX 100™ in PBS
Sorbitolpuffer	300 mM Sorbitol 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O 10 mM Tris pH 7,4 (HCl)
10 x Southern- Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM EDTA 70 mM SDS pH 7,0 (NaOH)
20 x SSPE	3 M NaCl 200 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM EDTA pH 7,0 (NaOH)

TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
TBS	137 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,6 (HCl)
TBST	0,1%[v/v] Tween 20 in TBS
TE	10 mM Tris · HCl 1 mM EDTA pH 8,0
YES	35 g/L YES Fertigmedium (Stratagene, Amsterdam / Niederlande), bei festen Medien 20 g/L Agar

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA und BAC-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA und BAC-DNA aus *E. coli* wurden mit dem "Plasmid Midi Kit" der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Bei Bluescript wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, bei pESP2 wurden 50 mL, bei BAC-DNA 100 mL Kulturvolumen eingesetzt. Isolierte Plasmid- oder BAC-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA in nativen Agarosegelen wurde nach Southern (1974) durchgeführt. Zur Extraktion elektrophoretisch aufgetrennter DNA wurde das "Qiaex Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) verwendet und dabei den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

2.2.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde mithilfe des "377 DNA Sequencers" (Applied Biosystems, Weiterstadt) unter Verwendung des "ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems) durch die Servicegruppe ADIS (MPIZ) durchgeführt.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen (Saiki *et al.*, 1988) wurden in einem Volumen von 25 – 50 µL in einem Thermo-cycler mit Heizdeckel (Biometra, Göttingen) durchgeführt. PCR-Mikrotiterplatten wurden mit Klebefolien (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) abgedichtet. Für PCR-Reaktionen mit *Taq*-DNA-Polymerase wurde ein Protokoll der Firma Qiagen (1997), für Reaktionen mit *Pfu*-DNA-Polymerase ein Protokoll der Firma Stratagene (1998) verwendet. Die in Tab. 2.1 aufgelisteten Oligo-nukleotide wurden zur Detektion von DNA-Konstrukten in transgenen Kartoffelpflanzen (Nr. 1 – 7), zur Klonierung in pESP2 (Nr. 8 – 18) oder pREP3X (Nr. 19 – 22) sowie zur Herstellung von Sonden für die Inhibitorfamilien oder die Unterscheidung dieser (Nr. 23 – 35) verwendet. PCR-Reaktionen wurden mithilfe des "Qiaquick Spin PCR Purification Kit" (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Primer	Sequenz	T _m [°C]
1	p1421/22-s	5'-TTGTCCCTCTCATCTTCAGTG-3'	60,3
2	pCI21A-s	5'-CATGAGGTGGCACTTTGGTAGTC-3'	62,4

Nr.	Primer	Sequenz	T _m [°C]
3	pCI21A-as	5'-TCCATTGACTGCATGCCATTGC-3'	60,3
4	pPBin19-s	5'-TCAATATTTACCTTCCCTCCCTC-3'	58,9
5	pPBin19-as	5'-CAACTGTTGGGAAGGGCGATC-3'	61,8
6	p1421/22AS-s	5'-GCTTTCAAGTACCCTCTCTTTGG-3'	60,0
7	p1421/22AS-as	5'-GGCGTGCCTTTTCCCAAAAATTG-3'	60,6
8	p1421/22LIC-s	5'-GACGACGACAAGATGCTTGACTCCCTGAAGTT-3'	69,5
9	p1421/22LIC-as	5'-CAGGACAGAGCATCACGCCTTGATGAACACAAATGG-3'	59,0
10	pP1H5LIC-s	5'-GACGACGACAAGATGCTACCTAGTGATGCTACT-3'	59,0
11	pP1H5LIC-as	5'-CAGGACAGAGCATCACTGGACTTGCTTGAAGGAGAC-3'	63,0
12	pP4B1LIC-s	5'-GACGACGACAAGATGCTACCTAGTGATGCTACT-3'	59,0
13	pP4B1LIC-as	5'-CAGGACAGAGCATCACTGGACTTGCTTGAAGGAGAC-3'	63,0
14	pP1E9LIC-s	5'-GACGACGACAAGATGGAATCTCCTCTACCTAAG-3'	59,0
15	pP1E9LIC-as	5'-CAGGACAGAGCATCAAACCTTGCTGGAATAAGACATC-3'	59,0
16	pP2B11LIC-s	5'-GACGACGACAAGATGGAATCTCCTGTACCTAAG-3'	59,0
17	pP2B11LIC-as	5'-CAGGACAGAGCATCAGACTTCCTGGAATAAGACATC-3'	61,0
18	pP4E1LIC-s	5'-GACGACGACAAGATGCTACCCACTGATACTACT-3'	59,0
19	pHis-Inh-s	5'-TGGCCTCGAGGATGCATCATCATCATCATCTTGTA CTCCCTGAAGTT-3'	65,0
20	pHis-Inh-as	5'-AGTGGGATCCTCACGCCTTGATGAACACAAATGG-3'	61,0
21	pInh-His-s	5'-TGGCCTCGAGGATGGTACTCCCTGAAGTT-3'	59,0
22	pInh-His-as	5'-AGTGGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGCGCCTT GATGAACACAAATGG-3'	65,0
23	pGroupA1-s	5'-AGCGGTACACCCGTTAGATTCATTCCTTTA-3'	65,4
24	pGroupA2-s	5'-GTGGTGATGTATACCTAGGAAA-3'	56,5
25	pGroupA3-as	5'-TTTCGTTGACAAGAGCCAAAC-3'	55,9
26	pGroupA4-s	5'-GAAGTGTTTATTTTCTTATGTTTG-3'	53,1
27	pGroupA5-as	5'-TACAATAAGTTGTAACCAAAATTTG-3'	53,1
28	pGroupB1-s	5'-GATGTTGGACCTAGCGGTACACCCG-3'	67,9
29	pGroupB2-s	5'-GTGATGCTACTCCAGTACTTGACG-3'	62,7
30	pGroupB3-s	5'-GTAAAGAACTTGATTCTCGTTTG-3'	55,3
31	pGroupB4-as	5'-CAATCTTGAACCAACTGCTATC-3'	56,5
32	pGroupB5-as	5'-AAACAGAATTGATCATCAGAG-3'	52,0
33	pGroupC1-s	5'-TGAGTTTCCTTTTGCTTCAAGTA-3'	55,9
34	pGroupC2-s	5'-GTAGGAAATGAAAACGACATCTTCAAGA-3'	60,7
35	pGroupC3-as	5'-GCACTGAAGATGAGAGGGACAATG-3'	50,0

T_m nach Angaben des Herstellers

2.2.5. Klonierung in pESP2

Zur Klonierung in pESP2-Vektoren wurden in pBluescript klonierte Inhibitorogene zunächst mithilfe von PCR-Reaktionen (2.2.4) amplifiziert. Die Klonierung erfolgte dann mit dem "ESP™ LIC Cloning Kit" der Firma Stratagene.

2.2.6 Klonierung in pREP3X

In pBluescript klonierte Inhibitorogene wurden mithilfe von PCR-Reaktionen amplifiziert und anschließend in den mit SmaI geschnittenen pREP3X-Vektor kloniert. Dabei wurden 10 ng geschnittene Vektor-DNA mit 100 – 200 ng amplifizierter Inhibitorogen-DNA, 2 U T4-DNA-Ligase und 1 U SmaI in Ligasepuffer (gesamt: 12 µL) 16 h bei 16°C inkubiert. Zur Effizienzsteigerung der Reaktion wurde Hexamminkobalttrichlorid in einer Endkonzentration von 1 µM zugesetzt (Rusche und Howard-Flanders, 1985). Der Ligationsansatz wurde nach Ethanolfällung in 5 µL H₂O aufgenommen.

2.2.7 Transformation von *E. coli*

2.2.7.1 Hitzeschocktransformation

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut (Epicurian Coli® XL10-Gold™, Stratagene) und je 50 µL mit 2 µL β-Mercaptoethanol gemischt. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und dabei alle 2 min vorsichtig geschüttelt. Die Vektor-DNA (2.2.5) wurde hinzugefügt und die Mischung weitere 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine 2-minütige Inkubation bei 42°C. Die Ansätze wurden mit je 500 µL NZY⁺ vermischt, eine Stunde bei 37°C inkubiert (Rollinkubator), anschließend in geeigneten Verdünnungen auf LB_{Amp}-Medium ausplattiert und 16 h bei 37°C inkubiert.

2.2.7.2 Elektroporation

Auf Eis aufgetaute kompetente Zellen (20 μ L, Elektromax™ DH10B™, Gibco BRL) wurden mit 10 ng DNA gemischt, in eine gekühlte Elektroporationskuvette gefüllt und in einem Elektroporator (BioRad, München) bei 1,8 kV transformiert. Die Mischung wurde mit 900 μ L SOC-Medium aufgefüllt und 50 min bei 37°C inkubiert (Rollinkubator). Geeignete Verdünnungen wurden auf LB_{Amp} ausplattiert und 12 h bei 37°C inkubiert.

2.2.8 Transformation von *S. Pombe*

Kompetente Hefezellen (SP-Q01, Stratagene) wurden bei RT aufgetaut und je 100 μ L mit 5 μ g des Expressionsvektors (zuvor in *E. Coli* vermehrt) vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden 30 min bei 30°C und dann weitere 20 min bei 42°C inkubiert. Geeignete Verdünnungen der Zellsuspension wurden auf EMM_{Thi} ausplattiert und 4 – 6 Tage bei 30°C inkubiert. Dabei wurden die Petrischalen zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm verschlossen.

2.2.9 Überprüfung transformierter Klone

Transformierte *S. Pombe*- oder *E. Coli*-Klone wurden mithilfe von PCR-Reaktionen mit für das Expressionskonstrukt spezifischen Primern (2.2.5) verifiziert.

2.2.10 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte nach der "random priming"-Methode (Feinberg und Vogelstein 1983, 1984).

50 ng DNA in einem Volumen von 12 μ L H₂O wurden 5 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und mit 4 μ L 5'OLB-Puffer (je 0,1 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 M HEPES, 2 mg/mL Hexadesoxyribonukleotid pdN6, 0,2 M Tris · HCl, $3,7 \cdot 10^{-5}$ M MgCl₂, 0,35 % [v/v] β -

Mercaptoetanol) gemischt. Nach Zugabe von 3 μL $\alpha^{32}\text{p}$ dCTP (30 mCi) und 1 μL Klenow-Enzym (2 U/ μL) wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei RT inkubiert. Freie Nukleotide wurden mittels einer Sephadex G50-Säule (1 mL, Puffer: 10 mM Tris \cdot HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 0,3 M NaCl, 0,1 % SDS) abgetrennt. Zur eluierten markierten DNA wurden 40 μL Heringssperma-DNA (10 mg/mL) zugegeben und 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.11 Analyse von mit Restriktionsenzymen verdauter BAC-DNA

2.2.11.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten auf denaturierenden Polyacrylamidgelen

Mit *TaqI* verdaute DNA-Fragmente wurden in einem 4 %igen Polyacrylamidgel nach einer Methode von Kreitman und Aquade (1986), modifiziert durch Gebhardt *et al.* (1989), durchgeführt.

2.2.11.2 Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen

Auf Polyacrylamidgelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden durch Elektrottransfer auf Nylonmembranen (Pall, Portsmouth, England) übertragen. Der Transfer wurde 1 h bei 70 mW/cm² in 0,4 x TPE (160 mM Tris, 4mM EDTA, pH 8,3 mit H₃PO₄) durchgeführt. Die DNA wurde anschließend 1 h bei 80°C in einem Vakuumofen kovalent gebunden. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde wie in 2.2.11.4 beschrieben durchgeführt.

2.2.11.3 Southern Blot

Die Analyse elektrophoretisch getrennter DNA-Fragmente durch Hybridisierung erfolgte in Anlehnung an Southern (1975). Das Agarosegel (0,8 % w/v) mit aufgetrennter DNA wurde 10 min in 0,2 N HCl (Denaturierung) und 45 min in 1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH geschüttelt und

anschließend weitere 45 min in 1 M Tris, pH 7,4, 1,5 M NaCl bei einmaligem Austauschen der Lösung neutralisiert. Die DNA wurde über Nacht in 20 x SSPE auf Biotinylated Nylonmembran (Pall, Portsmouth, England) mittels Kapillartransfer immobilisiert und anschließend durch UV-Quervernetzung (Stratalinker, Stratagene) und 2 h bei 80°C im Vakuum fixiert. Die Prähybridisierung zur Absättigung freier Membranflächen erfolgte in Hybridisierungspuffer (0,25 M Na₂HPO₄, 7 % [w/v] SDS, pH 7,0) mit 0,1 mg/mL denaturierter Heringssperma-DNA. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden zum Prähybridisierungsansatz hinzugefügt und die Hybridisierung über Nacht bei 65°C durchgeführt. Die Membranen wurden dreimal 15 min bei 65°C in 2 x SSPE gewaschen (geringe Stringenz), anschließend zweimal 1 h bei RT in Southern-Waschpuffer. Zum Waschen mit hoher Stringenz wurde 0,5 x SSPE bei 65°C verwendet. Die Membranen wurden zur Autoradiographie in Saranfolie eingewickelt und bei – 70°C auf Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR5) exponiert. Zur wiederholten Benutzung der Membranen wurden die radioaktiv markierten DNA-Sonden durch 30-minütiges Waschen in 0,1 % [w/v] SDS bei 75°C entfernt.

2.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde mit der nach Peterson (1977) modifizierten Methode von Lowry *et al.* (1951) bestimmt. Als Proteinstandard wurde BSA, Fraktion V verwendet. Zur schnellen Bestimmung der Proteinkonzentration von dialysierten Fraktionen bei Proteinaufreinigungen wurde die UV-Absorption (280 nm) gemessen.

2.2.13 Elektrophoretische Trennung von Proteinen

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer relativen Molekülmasse (M_r) durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) nach den Methoden von Laemmli (1970) und Neville (1971) aufgetrennt. Soweit nicht anders erwähnt wurden 12- %ige Gele verwendet.

2.2.14 Färbung von Proteinen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Bei der Färbung wurden die Gele für mindestens vier Stunden in 0,25% [w/v] Coomassie Brilliant Blue, 45% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig inkubiert und in 45% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig entfärbt. Bei Proteinen, die auf Nitrozellulose transferiert wurden, erfolgte die Überprüfung der Beladung des Gels und der Effizienz des Elektrottransfers durch eine reversible Färbung mit 0,2% [w/v] Ponceau S in 3% [w/v] Trichloressigsäure (Salinovich und Montalaro, 1986).

2.2.15 Elektrottransfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Semidry-Blotting)

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit einer Semidry-Blotting-Kammer (Sartorius, Göttingen) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL Nitrozellulose der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert. Der Transfer erfolgte nach dem Protokoll von Westmeier et al. (Pharmacia Sonderdruck RE-72). Als Transferpuffer diente ein kontinuierliches Puffersystem mit 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,038% [w/v] SDS und 20% [v/v] Methanol. Es wurde mit 2 mA/cm² 1 h geblottet.

2.2.16 Immunodetektion von Proteinen

Auf Nitrozellulose transferierte Proteine wurden mit spezifischen Antiseren immunologisch nachgewiesen. Die Nitrozellulosemembran wurde für eine Stunde mit 5% [w/v] Magermilchpulver in TBST-Puffer, pH 7,6 (Sättigungs- und Inkubationspuffer) bei 4°C unter Schütteln geblockt, um freie Membranflächen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran einmal 15 min und zweimal 5 min in TBST, pH 7,6, gewaschen. Es folgte eine Inkubation in einer Verdünnung des Antiserums in Inkubationspuffer für 1 h bei RT. Der monoklonale Antikörper gegen Oligohistidin aus Maus (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde 1:3000, die polyklonalen Antiseren aus Kaninchen (Dr. H. Glaczinski) gegen den

aufgereinigten Invertase-Inhibitor und die 16 kD-Bande des Proteaseinhibitors wurden 1:5000 und 1:10000 verdünnt. Die Membran wurde erneut gewaschen und mit einer Verdünnung des sekundären Antikörpers, einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus- oder Kaninchenimmunglobulin G-Antikörper (1:5000), 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran gewaschen und es erfolgte die Detektion der Proteine mit der "Enhanced Chemolumineszenz-Methode (ECL)". Dabei wurde das "ECL Western Blotting System" nach Protokoll des Herstellers verwendet und die Membran zur Detektion des Luminiszenzsignals auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) 10 s exponiert (alle Materialien von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.2.17 Induktion der Proteinexpression

Die Expressionskonstrukte der Vektoren pESP2 und pREP3X unterliegen der Kontrolle des *nmt1*-Promoters. Dieser wird bei einer Thiaminkonzentration $> 0,5 \mu\text{M}$ reprimiert, bei geringeren Konzentrationen aktiviert (Maundrell, 1990, Forsburg, 1993). Zur Überprüfung der Induzierbarkeit eines Klons wurde zunächst ein "Small Scale" Experiment durchgeführt. Hefezellen wurden auf EMM_{Thi} -Medium ausgestrichen und nach zwei Tagen 5 mL YES-Medium damit angeimpft. Mit 0,5 – 1 mL dieser Vorkultur, die über Nacht bei 30°C geschüttelt (250 rpm) wurde, wurden danach 10 mL frisches YES-Medium angeimpft ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,2 - 0,4$). Diese Zwischenkultur wurde weitere 5 h bei 30°C geschüttelt ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,7 - 1$) und dann in 2 x 5 mL aufgeteilt. Das Medium wurde durch Zentrifugation ($1000 \cdot g$, RT) von den Zellen abgetrennt und diese zweimal mit sterilem dH_2O gewaschen. Von jedem Ansatz wurde nun ein Pellet in 10 mL EMM_{Thi} aufgenommen (keine Induktion, Kontrolle), das andere in EMM (Induktion). Nach weiteren 18 – 20 h Schüttelinkubation (30°C , $\text{OD}_{600\text{nm}} = 6,0 - 8,0$) wurden die Zellen durch Zentrifugation ($1000 \cdot g$, 4°C) vom Medium getrennt.

Bei der Induktion im 1 L-Maßstab ("Large Scale") wurde aus einer 10 mL-Vorkultur eine 200 mL-Zwischenkultur angeimpft. Die mit dH_2O gewaschenen Zellen der Zwischenkultur wurden vollständig in 1 L EMM überführt. Die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ dieser Hauptkultur sollte zu Beginn ca. 0,2 betragen. Geerntete Zellen wurden entweder sofort aufgeschlossen oder bei -70°C gelagert.

Zur Überprüfung der Induktion der Proteinexpression wurden 1 mL der Hefekultur zentrifugiert ($1000 \cdot g$, $4^{\circ}C$, 1,5-mL Reaktionsgefäß) und die Zellen in 200 μL PBST aufgenommen. Es wurden ca. 0,2 g Glasperlen (425 – 600 μm , Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zugefügt. Nach 20-minütigem Vortexen der Mischung wurde mithilfe eines Mikroskopes kontrolliert, ob mindestens 80 % der Zellen zerstört waren. Es wurden 10 μL Überstand abgenommen, mit 10 μL 2 x SDS-Aufragpuffer gemischt, 3 min denaturiert und auf einem denaturierenden SDS-PAGE analysiert.

2.2.18 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Hefe

2.2.18.1 Aufreinigung von Fusionsproteinen mit GST-Tag

Hefezellen mit GST-Fusionsproteinen wurden nach Abtrennung des Mediums ($1000 \cdot g$, $4^{\circ}C$) mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in PBST (2,5 mL/g Zellen) resuspendiert. Hefeproteasen wurden durch Zugabe von "Yeast Proteinase Inhibitor Cocktail" (Sigma) gehemmt (16 $\mu L/mL$ PBST = PBST + PI). Der Suspension wurden 4 g Glasperlen (säuregewaschen, 425 - 600 μm) pro g Zellen zugefügt und die Mischung 30 – 40 min bei $4^{\circ}C$ gevortext. Der Überstand wurde vom Gefäßboden her mit einer Pasteurpipette abgenommen und die Glasperlen wurden mit der gleichen Menge PBST+PI gewaschen. Die vereinigten Suspensionen wurden 30 min zentrifugiert ($16000 \cdot g$, $4^{\circ}C$) und der resultierende klare Überstand durch eine Filterspritze (0,22 μm) sterilfiltriert. Das Filtrat wurde bei $-70^{\circ}C$ gelagert oder sofort affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Die Aufreinigung wurde mithilfe einer FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei $4^{\circ}C$ durchgeführt. Eine mit "GST Affinity Resin" (GSH, immobilisiert auf Agarose CL-4B) befüllte Säule (Bettvolumen 3 mL) wurde mit 5 Volumen PBS gewaschen ($F = 1$ mL/min, $A_{280nm} = 0$) und anschließend wurden 5 mL des Zelllysates aufgetragen ($F = 0,5$ mL/min). Die Säule wurde mit 25 Volumen PBST gewaschen ($A_{280nm} < 0,005$) und das Fusionsprotein mit GST-Elutionspuffer (10 mM GSH, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) eluiert. Fraktionen, die nach dem Chromatogramm Fusionsprotein enthielten (zusammen 10 – 12 mL), wurden sofort durch Ultrafiltration (Centiprep Concentrator YM-10, Millipore), 75 min, $3000 \cdot g$, auf 2 mL

konzentriert. Proben der verschiedenen Aufreinigungsschritte wurden auf einem denaturierenden SDS-PAGE analysiert. Das "GST Affinity Resin" wurde durch Waschen mit 5 Volumen 6 M Guanidin-hydrochlorid gefolgt von 5 Volumen PBS regeneriert. Zur Entfernung von freiem GSH und zum Pufferwechsel wurde das Fusionsproteinkonzentrat gegen H₂O oder Puffer (z.B. 10 mM Tris, pH 7,0, 10 mM Na₂HPO₄, pH 6,0) für mindestens 12 h dialysiert (MWCO 12 – 14 kD). Aufgereinigte Fusionsproteine wurden mit 10 % [v/v] Glycerin bei – 20°C gelagert.

2.2.18.2 Native Aufreinigung von Fusionsproteinen mit His-Tag

Zur nativen Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen (4°C) wurden 2,5 g Hefezellen mit 5 mL Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 10 g Glasperlen 30 min gevortext. Der Überstand wurde abgenommen und die Glasperlen mit 7 mL Puffer gewaschen. Die vereinigten Suspensionen wurden zentrifugiert (30 min, 16000 rpm) und der Überstand sterilfiltriert. Je 0,5 mL resuspendiertes "Ni-NTA-Resin" (Qiagen, Hilden) wurden mit 2 mL Lysat vermischt und 1 h auf einem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine leere Säule gefüllt und der Durchfluss aufgefangen. Es wurde mit 2 x 2mL Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) gespült und danach mit 4 · 250 µL Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 0,05 % Tween®20, pH 8,0 oder pH 4,9) eluiert. Alle Fraktionen wurden auf einem denaturierenden SDS-PAGE analysiert.

2.2.18.3 Denaturierende Aufreinigung von Fusionsproteinen mit His-Tag

Bei der denaturierenden Aufreinigung (RT) bestand der Puffer aus 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris · HCl und 8 M Harnstoff. Der Lysepuffer wurde auf pH 8,0, der Waschpuffer auf pH 6,3 und der Elutionspuffer auf pH 4,5 eingestellt. Der Zellaufschluss sowie die Affinitätschromatographie wurden mit den entsprechenden denaturierenden Puffern wie bei der

nativen Aufreinigung durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden nach Analyse auf einem denaturierenden SDS-PAGE zu weiteren Versuchen bei -20°C gelagert.

2.2.19 Renaturierung von Fusionsproteinen mit His-Tag

Die Denaturierung von Fusionsproteinen mit His-Tag wurde in Anlehnung an Buchner und Rudolph (1991) durchgeführt. Fraktionen aus der denaturierenden Aufreinigung wurden mit 3 Volumen Argininpuffer (100 mM Arginin, 2,5 mM GSH, 0,25 mM GSSG, 100 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) gemischt. Die Lösung wurde in 500 μL Mikrodialysierkapseln (MWCO 12 – 14 kD) gefüllt und 2,5 h unter Rühren bei RT gegen 2 x 500 Volumen Argininpuffer dialysiert. Anschließend folgte eine 12-stündige Dialyse gegen 50 mM Acetatpuffer (pH 5,2, 4°C). Dialysate wurden auf einem denaturierenden SDS-PAGE analysiert und mit 10 % [v/v] Glycerin bei -20°C gelagert.

Alternativ wurde ein Versuch zur Renaturierung von an "Ni-NTA-Resin" gebundenem Fusionsprotein durchgeführt. Hierzu wurde zunächst wie bei der "denaturierenden Aufreinigung" beschrieben verfahren. Zum Waschen der Säule wurden sechs Waschpuffer mit abnehmender Harnstoffkonzentration (8, 6, 4, 2, 1, 0 M) verwendet. Die Elution wurde mit Elutionspuffer (nativ, pH 4,5) durchgeführt und die Elutionsfraktionen auf einem denaturierenden SDS-PAGE analysiert.

2.2.20 Spaltung von GST-Fusionsproteinen mit Enterokinase

Das GST-Tag kann mithilfe von Enterokinase vom Fusionsprotein abgespalten werden. Dabei wird das Fusionsprotein am C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz [D-Y-K-D-D-D-D-K] gespalten.

Dazu wurden 0,5 mg Fusionsprotein (1mg/mL) zunächst in einem Centricon-YM10-Konzentrator (Millipore, Eschborn) in Enterokinase-Reaktionspuffer (50 mM Tris \cdot HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 0,1 % Tween®20) umgepuffert und dann mit 6 U Enterokinase (Novagen, Cambridge / USA) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 16 h bei RT inkubiert, dann

mit 30 μL STI-Agarose (Stratagene, Amsterdam / Niederlande) und 100 μL "GST Affinity Resin" vermischt und 40 min bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand durch Zentrifugation in Filterreaktionsgefäßen (Novagen) abgetrennt. Das aufgereinigte Spaltprodukt wurde in 20 mM Na_2HPO_4 (pH 7,0) umgepuffert und mit 10 % [v/v] Glycerin bei –20°C gelagert. Alle Fraktionen wurden auf einem denaturierenden SDS-PAGE analysiert.

2.2.21 Präparation von Invertase aus *S. Tuberosum*

2.2.21.1 Herstellung von Kartoffelsaft

Kartoffeln des Sortenstandards "Granola" wurden etwa drei Monate lang bei 8°C gelagert. Je 1,1 – 1,2 kg Knollen wurden geschält und mit einem Entsafter (Braun, Frankfurt / Main) entsaftet. Der Saft wurde in einem Gefäß, in dem 100 mL 1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 mit 100 mM Na_2SO_3 , 1mM PMSF und 2 mM Benzamidin vorgelegt waren, aufgefangen. Der Saft wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

2.2.21.2 Aufreinigung von Kartoffelinvertase

Invertase aus Klartoffelsaft (Granola) wurde in Anlehnung an Methoden nach Burch *et al.* (1992) sowie Bracho und Whitaker (1989a, b) isoliert.

Der bei 4°C aufgetaute Saft (ca. 700 mL / kg Kartoffeln) wurde 30 min bei 15000 \cdot g zentrifugiert und der Überstand (ca. 600 mL) gegen 3 x 2 L deionisiertes Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze 10 kDa). Der entstandene Niederschlag wurde 30 min bei 15000 \cdot g sedimentiert und die klare Lösung in 10 mL-Portionen in 50 mL-Gefäße (Falcon) gefüllt. Diese wurden mit Miracloth (Calbiochem, Schwalbach) verschlossen, in flüssigem N_2 gefroren und 72 h gefriergetrocknet (Endtemperatur 4°C). Die Aufreinigung der Invertase wurde mittels einer Affinitätschromatografie an einer FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit einer Fließrate von 1 mL/min bei 4°C durchgeführt. Eine mit ConA-Sepharose-4B (Fluka, Neu-Ulm) gefüllte Säule (Bettvolumen 25 mL) wurde mit ConA-Puffer (20 mM

Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, je 1 mM CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2) equilibriert. 15 der gefriergetrockneten Extrakte wurden in 100 mL ConA-Puffer gelöst und unlösliches Material 10 min bei $15000 \cdot g$ sedimentiert. Nach Aufbringen der Lösung auf die Säule wurde diese mit ConA-Puffer gewaschen ($A_{280\text{nm}} < 0,005$) und anschließend mit 50 ml ConA-Puffer, 30 mM Methyl- α -D-mannopyranosid eluiert. Die Elutionsfraktionen 14 bis 19 (je 2 mL, $A_{280\text{nm}} > 0,1$) wurden sofort durch Ultrafiltration (Centriprep YM10, Millipore, Eschborn) bei $3000 \cdot g$ auf 2 mL konzentriert und 16 h gegen 800 mL 20 mM Natrium-phosphatpuffer pH 6,0 dialysiert (Ausschlussgrenze 10 kDa). Das Konzentrat wurde auf Invertaseaktivität überprüft und mit 10% [v/v] Glycerin bei -20°C gelagert.

2.2.22 Bestimmung inhibitorischer Aktivität von Proteinen

2.2.22.1 Relative Invertaseaktivität

Qualitative Bestimmung der Invertaseaktivität

Zur schnellen Bestimmung von Invertaseaktivität in Fraktionen bei der chromatographischen Aufreinigung wurden 100 μL Probe mit 100 μL 250 mM Saccharoselösung (20 mM EDTA) bei 37°C 30 min inkubiert und anschließend mit 100 μL TCC-Reagenz versetzt (0,1 % [w/v] 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid in 1N NaOH). Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln verfärbten sich invertasehaltige Proben rot.

Bestimmung der relativen Invertaseaktivität nach Nelson-Somogyi

Die Invertaseaktivität wurde durch eine Bestimmung des Gehaltes an reduzierenden Zuckern nach Nelson (1944) gemessen. Vor Gebrauch wurde das Kupferreagenz aus 25 Teilen Reagenz A (240 mM Na_2CO_3 , 90 mM $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 240 mM NaHCO_3 , 1,4 M Na_2SO_4) und einem Teil Reagenz B (60 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 – 2 Tropfen H_2SO_4) hergestellt. Für die Aktivitätsbestimmung wurden Invertaselösungen oder Inhibitorprotein-Invertasemischungen in

380 μL Reaktionsvolumen (80 mM Acetatpuffer, pH 4,6) zunächst 10 min bei 37°C vorinkubiert und nach Zugabe von 20 μL 20 % [w/v] Saccharoselösung eine weitere Stunde inkubiert. Es wurden 200 μL Kupferreagenz zugefügt und 20 min gekocht. Nach Abkühlung auf Eis wurden 200 μL Arsen-Molybdatreagenz und 1,4 mL H_2O zugegeben und die Absorption der Lösung bei 660 nm bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit Glucoseverdünnungen angelegt, Vergleichswerte wurden mit Hefeinvertase [EC 3.2.1.26] gemessen, wobei eine Invertase-Unit als die Enzymmenge definiert wurde, die 1 μmol Saccharose pro Minute bei 37°C und pH 4,6 spaltete. In einem Reaktionsansatz wurden 2 – 3 mU Invertase eingesetzt, was 10 μL einer 1 : 100 verdünnten Lösung der aufgereinigten Kartoffelinvertase entsprach.

Bestimmung der relativen Invertaseaktivität mit Glucoseoxidase und Peroxidase

Bei dieser Reaktion wird β -D-Glucose durch Glucoseoxidase [EC 1.1.3.4] zu D-Gluconsäure und H_2O_2 umgesetzt. Letzteres wird mit o-Dianisidin (reduziert, farblos) durch Peroxidase [EC 1.11.1.7] zu o-Dianisidin (oxidiert, rot) umgesetzt. Zur Herstellung des Reaktionsreagenzes wurden 30 U GOD, 66 U POD und 0,66 mg o-Dianisidin (reduziert) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gelöst.

Die Invertase- oder Invertase-Inhibitorreaktion wurde wie in beim Test nach Nelson und Somogyi beschrieben durchgeführt und durch dreiminütiges Aufkochen beendet. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) wurden 300 μL Überstand mit 1,2 mL Reaktionsreagenz gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 25 μL 4 N HCl zugefügt und nach fünf Minuten die Absorption bei 420 nm gemessen

2.2.22.2 Relative Proteaseaktivität

Relative Aktivität von Trypsin, α -Chymotrypsin, Papain und Subtilisin

Die Proteasen Trypsin [EC 3.4.21.4], α -Chymotrypsin [EC 3.4.21.1], Papain [EC 3.4.22.2] und Subtilisin [EC 3.4.21.14] wurden in ihren jeweiligen Reaktionspuffern in einer Konzentration

von 5 mg/mL gelöst. Als Puffer wurden für Trypsin 50 mM Tris · HCl, 20 mM CaCl₂ (pH 7,5), für Subtilisin und α-Chymotrypsin 50 mM Tris · HCl und 5 mM CaCl₂ (pH 7,5) und für Papain 50 mM Natriumacetat (pH 6,0) mit 2 mM DTT verwendet. Für die Reaktion wurden 50 µL 4 x Reaktionspuffer, 50 µL Inhibitorprotein-Verdünnung und 2 µL Proteaselösung gemischt und mit H₂O auf 200 µL aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden 10 min bei 25°C vorinkubiert, mit 200 µL Substratlösung (2 % [w/v] Azocasein) vermischt und 1 h inkubiert (α-Chymotrypsin 3 h). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µL 12 % [w/v] Trichloressigsäure beendet und nach 30 min wurde ausgefallenes Protein durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde mit 400 µL 4 N NaOH versetzt und sofort seine Absorption bei 440 nm gemessen. Als Referenzwerte dienten Ansätze ohne Inhibitorlösung (100 % Aktivität) sowie ohne Inhibitor- und Proteaselösung (Nullwert). *Tabelle 2.2* zeigt die Definitionen der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Proteasen.

Tab. 2.2: Verwendete Proteasen und ihre spezifischen Aktivitäten.

Enzym	U/mg	1 U = Enzymmenge,
Papain	3,2	die bei 253 nm eine Extinktionszunahme von 0,001/min bei pH 7,6 und 25°C bewirkt (Substrat: N-Benzoyl-L-argininethylester)
Trypsin	9550	
Subtilisin	24	die 1 µmol Tyrosin /min bei pH 7,5 und 37°C freisetzt (Substrat: Hämoglobin)
α-Chymotrypsin	68,6	die 1 µmol Suc-(Ala) ² -Pro-Phe-4-NA /min bei pH 7,8 und 25°C hydrolysiert
Aspergillopepsin I	0,9	die 1 µmol Tyrosin /min bei pH 2,8 und 37°C freisetzt (Substrat: Hämoglobin)
Pepsin A	4550	die bei 280 nm eine Extinktionszunahme von 0,001/min bei pH 2,0 und 37°C bewirkt (Substrat: Hämoglobin)

Relative Aktivität von Protease aus *Aspergillus saitoi*

Zur Herstellung der Substratlösung wurden 3,5 g Hämoglobin (Rind) in 50 mL H₂O gelöst und 2 d lang gegen 3 x 2,5 L deionisiertes H₂O dialysiert. Der Lösung wurden 15 mL Citrat-Phosphatpuffer (1 M C₆H₅Na₃O₇, 2 M NaH₂PO₄, pH 2,6) zugefügt, anschließend wurde sie mit

H₂O auf 150 mL aufgefüllt, durch einen Papierfilter filtriert und bei –20°C gelagert. 10 mg/mL Aspergillopepsin I [EC 3.4.23.18] wurden in H₂O gelöst, Inhibitorlösungen wurden über Nacht gegen H₂O dialysiert (4°C). 400 µL Substratlösung und 200 µL Enzymlösung oder Enzym-Inhibitorsmischung wurden 5 min bei 37°C vorinkubiert, danach gemischt und weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µL 5 % [w/v] Trichloressigsäure beendet und nach Abtrennung des Überstandes (10 min, 13000 rpm) die Absorption bei 280 nm gemessen.

Relative Aktivität von Protease aus Schweinemägen

Als Substratlösung wurden 8 g Hämoglobin in 50 mL H₂O gelöst, 2 Tage bei 4°C gegen 3 x 2,5 L H₂O dialysiert, auf 100 mL aufgefüllt und bei –20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung 1 : 3 verdünnt, mit 1N HCl auf pH 2,2 eingestellt und auf eine Endkonzentration von 2 % [w/v] Hämoglobin verdünnt. Inhibitorlösungen wurden über Nacht gegen H₂O dialysiert und 10 mg/mL Pepsin A [EC 3.4.23.1] in H₂O gelöst. 1 mL des Substrates und 50 µL Enzymlösung oder Enzym-Inhibitorsmischung wurden 5 min bei 37°C vorinkubiert, dann gemischt und weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 2 mL 5 % [w/v] Trichloressigsäure beendet und nach Abtrennung des Überstandes (10 min, 13000 rpm) die Absorption bei 280 nm gemessen.

2.2.23 Transgene Kartoffelpflanzen

2.2.23.1 Expressionskonstrukte

Solanum tuberosum der Sorte "Désirée" wurde mit von Dr. J. Muth hergestellten Expressionskonstrukten (unveröffentlichte Daten, s. Abb. 2.1) der Invertase-Inhibitorgen-Kandidaten 1421 und 1422 transformiert. Von beiden Genen waren dabei Konstrukte mit und ohne Signalpeptid sowie "Antisense"-Konstrukte erstellt worden. Alle Konstrukte wurden

durch den von Dr. A. Schneider isolierten knollenspezifischen und kälte-induzierbaren Promoter *ci21A* kontrolliert (Schneider *et al.*, 1997).

Die resultierenden aus Kalli regenerierten Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 20°C kultiviert. Die 140 verschiedenen Pflanzenlinien wurden durch PCR-Reaktionen mit konstruktsspezifischen Primerkombinationen (2.2.5) auf Vorhandensein des jeweiligen Konstruktes überprüft. Die geernteten Knollen wurden drei Monate lang bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Gehalt an reduzierenden Zuckern bestimmt (2.2.24). Die Knollen von insgesamt 80 Linien wurden zur Weiterkultur erneut ausgelegt

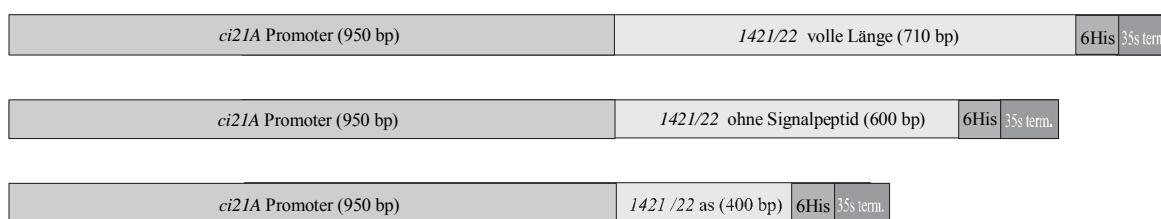


Abb. 2.1: Expressionskonstrukte.

2.2.23.2 Gewinnung von DNA aus Kartoffelblättern

DNA aus Kartoffelblättern zur Durchführung von PCR-Reaktionen wurde nach der Methode von Edwards *et al.* (1991) extrahiert.

2.2.24 Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern aus Kartoffelknollen

2.2.24.1 Herstellung von Zuckerauszügen

Transgene Kartoffelknollen sowie Sortenstandards wurden drei Monate lang bei 4°C gelagert. Die Knollen wurden geschält und aus der Mitte ca. 1 x 1 x 2 cm große Quader herausgeschnitten, bei sehr kleinen Transgenen wurden ganze Knollen verwendet. Je drei Proben einer Pflanze wurden dann gefriergetrocknet und gemahlen. Je 100 mg Kartoffelpulver

wurden in 1 mL 80 % [v/v] Ethanol in Schraubgefäßen suspendiert und schüttelnd 10 min in einem auf 80°C temperierten Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 h in einem Ofen bei 80°C weitergeschüttelt (ca. 2500 rpm). 800 µL Überstand wurden nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) in ein frisches Gefäß überführt und in einem SpeedVac-Konzentrator (Savant, Holbrook / USA) auf ein Volumen von 100 µL reduziert. Die Proben wurden auf 1 mL mit H₂O aufgefüllt und Rückstände durch vortexen gelöst. Die Zuckerauszüge wurden bei –20°C gelagert.

2.2.24.2 Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern

Zur Messung des Gehaltes an reduzierenden Zuckern wurde der D-Glucose / D-Fructose UV-Test (Roche) in einer miniaturisierten Form in Mikrotiterplatten verwendet. Das Reaktionsvolumen wurde dabei auf 1/10 reduziert, ansonsten jedoch den Herstellerangaben gefolgt. Die Absorption bei 340 nm wurde mittels eines Mikrotiterplatten-Readers (EMS Labsystems) bestimmt. Eichgeraden wurden mit Fructose- und Glucosestandardlösungen angelegt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mithilfe des Computerprogrammes SeroCalc 4.0 (Demos Computer GmbH, Köln).

2.2.25 Versuche zur Inhibierung mikrobieller Pilze durch Inhibitorproteine

2.2.25.1 Versuch zur Inhibierung von *Phytophthora infestans*

Zur Herstellung fester Roggen-PDA-Medien für *P. Infestans* [R1], einem für Kartoffel pathogenen mikrobiellen Pilzes, wurden 200 g Roggenkörner in 800 mL H₂O autoklaviert und über ein Sieb filtriert. Der Sud wurde mit 39 g PDA vermischt, auf 1 L aufgefüllt, erneut autoklaviert und in 9 cm-Petrischalen gegossen.

In einen Teil der Platten wurden in 1,5 cm Abstand vom Mittelpunkt je drei Löcher (0,8 cm Durchmesser) mit einem sterilen Korkstecher ausgestanzt. Die Löcher wurden mit je 100 µL 0,2 % [w/v] Agaroselösung gefüllt und anschließend mit 100 µL Fusionsproteinlösung (1,5

mg/mL, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,4). Als Kontrollen wurden Phosphatpuffer sowie eine BSA-Lösung (1 mg/mL) verwendet. Auf den Mittelpunkt der Nährmedien, zwischen die Löcher, wurde ein ca. 4 mm großes Mycelstück aufgebracht. Auf einen anderen Teil der Platten wurden je 150 µL der genannten Lösungen ausplattiert und ebenfalls Mycel aufgebracht. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und 8 Tage inkubiert (16 h Licht, 17°C, 8 h im Dunkeln, 10°C).

2.2.25.2 Inhibierung des Wachstums mikrobieller Pilze in Mikrotiterplattentests

Konzentrierte Sporenlösungen der Pilze *Fusarium moniliforme*, *Fusarium culmorum* [IMI 80420], *Neurospora crassa* [FGSC 2489] und *Fusarium naganai* wurden nach einem Protokoll nach Broekaert *et al.* (1990) hergestellt. Stammkulturen der für Getreide pathogenen Pilze waren im MPIZ vorhanden.

Lösungen der Fusionsproteine GST-P1H5.B, GST-P2B11.A, GST-P4E1.A und GST-1423.C (1,5 mg/mL) wurden für 16 h gegen H₂O dialysiert. In die Vertiefungen der Reihe "A" auf einer Mikrotiterplatte wurden 20 µL der unverdünnten Proteinlösungen pipettiert, in den folgenden Reihen verringerte sich die Konzentration um jeweils die Hälfte. Kontrollen wurden mit H₂O gefüllt. Die Sporenlösungen wurden in ½ PDB-Medium (12 g PDB/L) verdünnt und je 80 µL in die Vertiefungen pipettiert (Endkonzentration: $1,6 \cdot 10^4$ /mL). Die Platten wurden 48 h bei 25°C im Dunkeln unter Schütteln inkubiert und währenddessen alle 12 h auf Pilzwachstum kontrolliert. Pilzmycel wurde unter dem Mikroskop vermessen und fotografiert.

2.2.26 Computeranalyse

DNA- und Proteinsequenzen wurden mithilfe des Wisconsin Package (Devenaux *et al.*, 1984), Version 10,0-UNIX, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA durchgeführt. Zum Vergleich von DNA- oder Proteinsequenzen wurden die Programme BESTFIT und PILEUP verwendet. Die Ähnlichkeit von Sequenzen wurde desweiteren mit den Programmen DISTANCES und GROWTREE untersucht. Die grafische Darstellung der Sequenzvergleiche

wurde mit SEQLAB bearbeitet. Biochemische Daten der Proteine wurden mithilfe des ExPASy WWW Servers (Swiss Institute of Bioinformatics) berechnet (Appel *et al.*, 1994).

2.2.27 Sonstiges

Nicht beschriebene Standardmethoden wurden nach Maniatis *et al.* (1982, 1989) durchgeführt. Bei Restriktionsenzymreaktionen wurde den Herstelleranweisungen gefolgt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Kunitz-Typ Inhibitorklonen aus *S. tuberosum*

3.1.1 Sequenzanalyse von Inhibitoren aus Knollen von *S. tuberosum*

Die Sequenzen von 81 Kunitz-Typ Inhibitorklonen aus Kartoffelknollen wurden verglichen. 78 dieser Klone wurden mithilfe des Computerprogrammes BLAST aus einer EST-Bibliothek (EST = Expressed Sequence Tag) entnommen. Die Bibliothek umfasste 1596 Klone, davon 868 der Sorte Provita und 728 der Sorte Saturna. 65 der Inhibitorklone stammten von der Sorte Provita (7,5 % der Provita-Klone) und 14 von Saturna (1,9 % der Saturna-Klone). Den Sequenzen wurden die von Dr. H. Glaczinski isolierte Klone 1421, 1422 und 1423, ebenfalls aus Provita stammend (unveröffentlichte Daten), hinzugefügt. 1421 und 1422 waren Kandidaten für das Invertase-Inhibitor Gen, 1423 ein zu diesen zu 97 % homologer Klon. Von identischen Klonen (*Tab. 3.1*) wurde nur je ein Vertreter in die weitere Sequenzanalyse einbezogen, insgesamt wurden 57 verschiedene Klone analysiert. Die von den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mithilfe des Programmes PILEUP verglichen und ihrer Ähnlichkeit entsprechend sortiert. Dabei waren drei Hauptgruppen, A, B und C, zu erkennen, die Gruppenzuordnung erfolgte hierbei nach Ishikawa *et al.* (1994). Es konnten 16 Klone (19,8 %) zu Gruppe A, 38 (46,9 %) zu B und 27 (33,3 %) zu C zugeordnet werden.

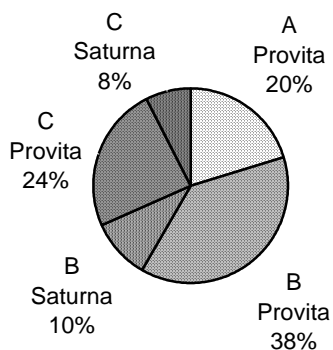


Abb. 3.1: Anteile der Gruppen und Sorten an den Inhibitorklonen, Gesamtmenge = 78.

Tab. 3.1: Identische Inhibitorklone, Gesamtmenge zur Berechnung der Prozentwerte = 81.

Gruppe	Inhibitorklon	Identische Klone, Anteil an Gesamtmenge [%]
A	P1E9	P1C5, P1G5, P2H11
	P4F10	P7A2
	P9D7	P3B12
B	P2D5	P2C5
	P4B1	P1H12, P9F9
	P7C10	P2B5
	P7D8	P1H7, P2E1, P7B8, P7H3, P9E1
	S5C10	S8+9G5
C	1421	P3A12
	1423	P4A2, P7G1
	P3A7	P2G10, P2G12
	P7B11	P3D3
	P7D1	P2C10, P3F3, P4B2
	S8+9B11	S9+11B2

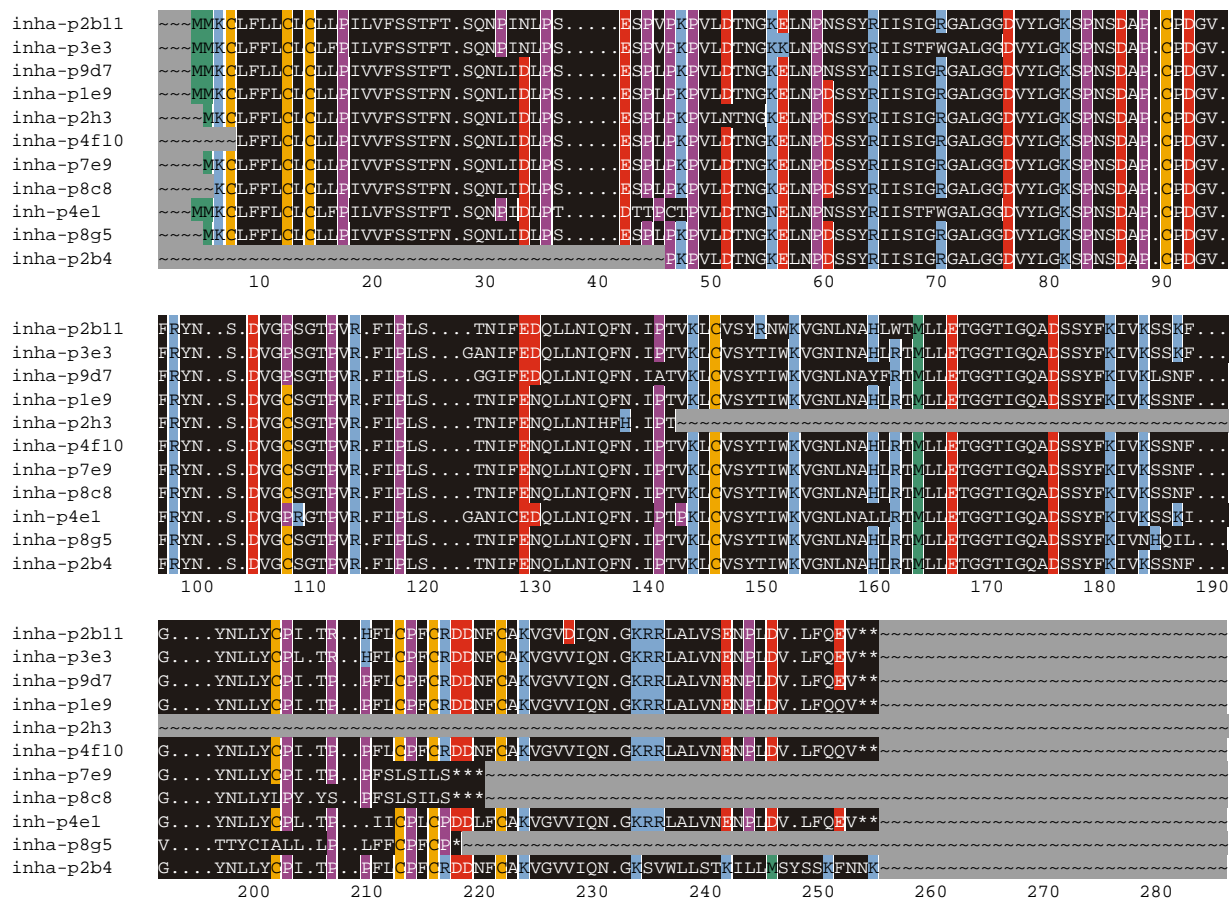


Abb. 3.2: Vergleich von Kunitz-Typ Inhibitorsequenzen der Gruppe A. Saure Aminosäuren (rot), basische Aminosäure (blau), Cystein (orange), Methionin (grün), Prolin (violett).

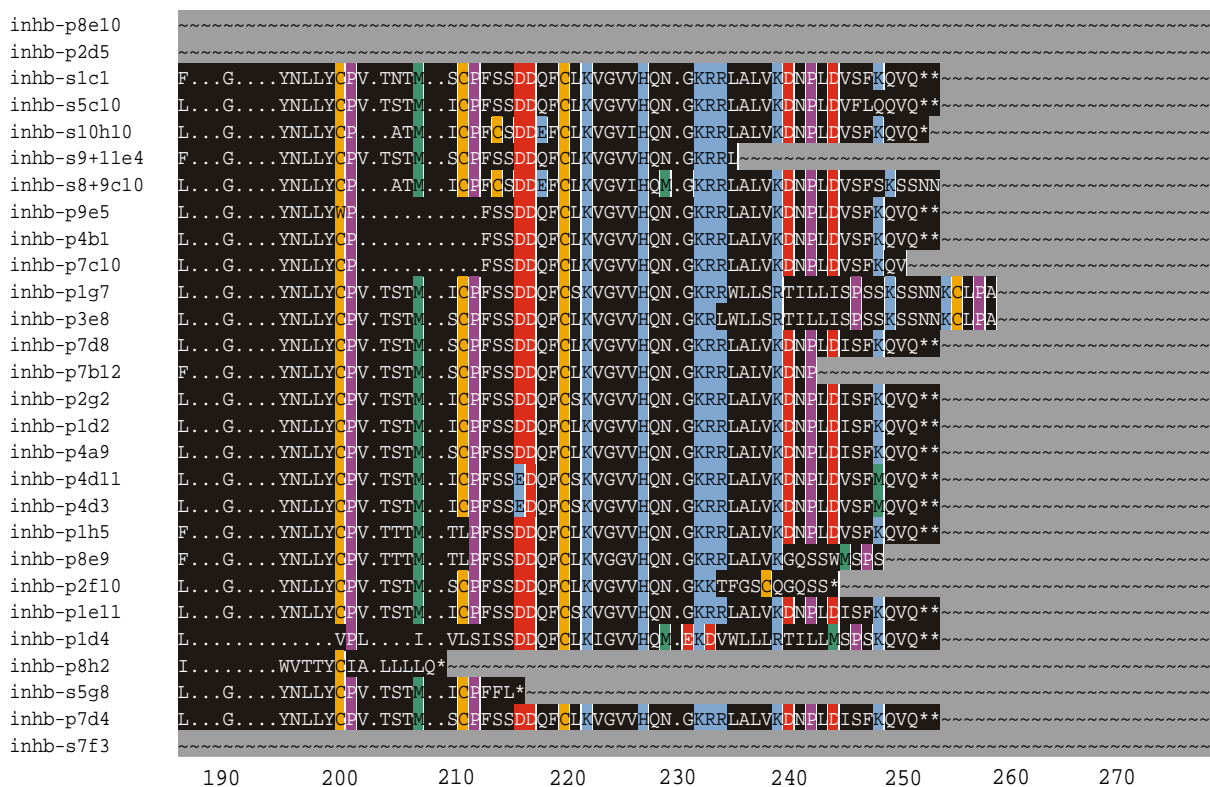


Abb. 3.3a (vorherige Seite), 3.3b: Vergleich der Kunitz-Typ Inhibitorsequenzen der Gruppe B. Hervorgehoben wurden saure Aminosäuren (rot), basische Aminosäuren (blau), Cystein (orange), Methionin (grün), Prolin (violett).

Inhibitoren der Gruppe A wurden ausschließlich in den EST-Klonen der Sorte Provita gefunden, während die Gruppen B und C in beiden Sorten vertreten waren. Von den 78 aus der EST-Bibliothek stammenden Klonen waren 18 % Saturna- und 82 % Provita Klone (Abb. 3.1).

Die Abbildungen 3.2 – 3.4 zeigen Vergleiche der Inhibitoren auf Proteinebene für die drei Gruppen. Dabei wurden Aminosäuren, welche den biochemischen Charakter eines Proteins wesentlich beeinflussen, hervorgehoben, so dass Austausche dieser Aminosäuren zu erkennen waren: saure und basische Aminosäuren, die den isoelektrischen Punkt eines Proteins beeinflussten, Cystein, das die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglichten und Prolin, das durch seine Ringstruktur keine freie Drehung der Peptidbindung ermöglichte. Die den Aminosäuresequenzen zugrunde liegenden DNA-Sequenzen wurden mindestens zweimal von beiden Seiten sequenziert. Es wurden, soweit möglich, die vollständigen Aminosäuresequenzen vom Signalpeptid bis zum C-Terminus dargestellt. Ein Teil der Sequenzen war jedoch unvollständig. Bei den Inhibitoren der Gruppe A hatten die ersten neun Aminosäuren nach dem

Signalpeptid die Sequenz E-S-P-L-P-K-P-V-L mit Ausnahme des Inhibitors P4E1.A (*Abb. 3.2, Pos. 42*). Bei den Inhibitoren der Gruppe B lautete diese Sequenz L-P-S-D-A-T-P-V-L (*Abb. 3.3, Pos. 34*), bei Gruppe C schließlich L-V-L-P-E-V-Y-D-Q (*Abb. 3.4, Pos. 44*). In allen Gruppen waren stark konservierte Regionen festzustellen, in denen hauptsächlich konservative Austausche von Aminosäuren auftraten. Für Gruppe A konnte eine solche Region zwischen den Positionen 50 und 130, für Gruppe B zwischen 35 und 120 und für Gruppe C zwischen 60 und 110 festgestellt werden. In diesen Regionen lagen auch für Kunitz-Typ Inhibitoren typische, konservierte Aminosäurereste (Walsh und Twitchell, 1991): ein Glycinrest (Pos. 54), ein Tyrosinrest (Pos. 63) sowie zwei weitere Glycinreste (Pos. 74, 75). Der letzte Glycinrest wurde bei einigen Klonen der Gruppe C gegen Alanin ausgetauscht, nur der Klon S8+9B11.C weist in einem der Reste einen nicht-konservativen Austausch gegen Glutaminsäure auf. In den übrigen Regionen waren zahlreiche nicht-konservative Austausche zu erkennen, insbesondere im hinteren Teil der Gruppen ab Position 190. In Gruppe B wurden insgesamt die wenigsten nicht-konservativen Änderungen in der Aminosäuresequenz festgestellt. Die Klone der Gruppen A und C variierten stärker. In Gruppe A fielen dabei Austausche von Prolin und Cystein (Pos. 107, 201 – 216) sowie ein in den ersten Aminosäuren nach dem Signalpeptid (P4E1.A) abweichender Klon auf. In Gruppe C waren neben zahlreichen Veränderungen bei sauren und basischen Resten (Pos. 40 – 43, 147 – 157, 228 – 232) bei 8 Klonen zusätzliche Methioninreste (Pos. 113) zu erkennen.

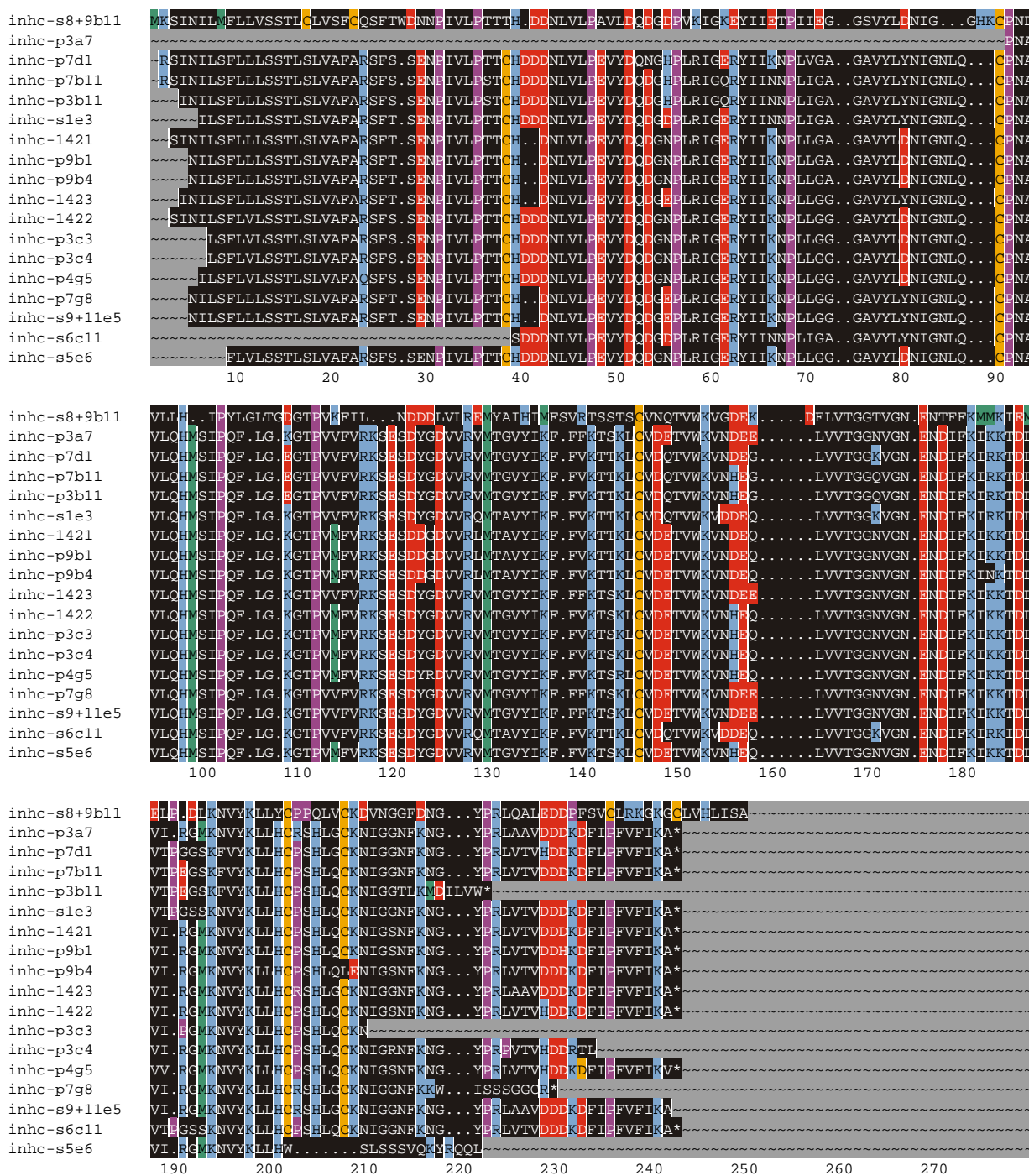


Abb. 3.4: Vergleich der Kunitz-Typ Inhibitorsequenzen der Gruppe C. Hervorgehoben wurden saure Aminosäuren (rot), basische Aminosäuren (blau), Cystein (orange), Methionin (grün), Prolin (violett)

3.1.2 Homologie der Inhibitorgruppen

Neben der vergleichenden Untersuchung der Aminosäuresequenzen nach Substitutionen von Resten (*Abb. 3.2 – 3.4*) wurde auch die Ähnlichkeit der Inhibitorklone in Form eines Phylogramms betrachtet (*Abb. 3.5*). Das Baumdiagramm wurde nach 1070 Wiederholungen der Berechnung mithilfe des Computerprogramms PAUPSEARCH erstellt. Es wurden "Bootstrap-Werte" berechnet und für die wichtigsten Verzweigungen angegeben. Für die Hauptverzweigungen zu den Gruppen waren diese Werte höher als 90. Damit konnten die bereits in den Sequenzvergleichen festgestellten drei Gruppen bestätigt werden. Bezüglich der Homologie der Aminosäuresequenzen waren die Gruppen A und B mit mehr als 80 % (75 % identisch) einander sehr ähnlich, während die Gruppen B und C zu 46 % (38 %) und die Gruppen A und C zu 40 % (34%) ähnlich waren. Innerhalb der Gruppen lag die Homologie bei mindestens 90 %, wobei das Phylogramm die Feststellung aus dem Aminosäurevergleich bestätigte, dass Mitglieder der Gruppen A und C untereinander stärker variierten als Mitglieder der Gruppe B. Der Klon S8+9B11.C, der sich bereits durch zahlreiche nicht-konservative Substitutionen von Aminosäuren von der Gruppe C unterschied, war nach dem Phylogramm ein Vertreter einer vierten Gruppe.

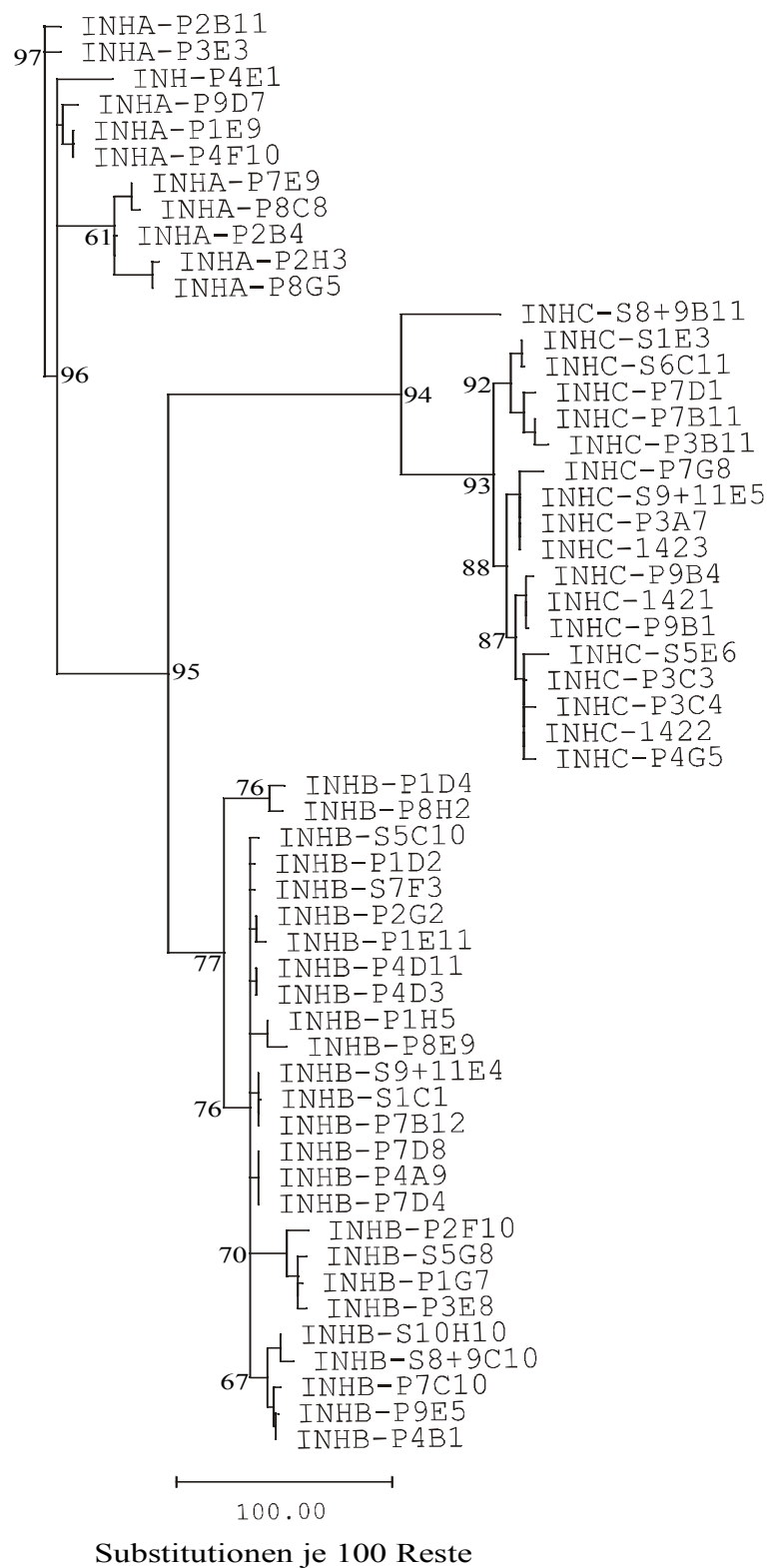


Abb. 3.5: Phylogramm der Kunitz-Typ Inhibitoren aus Kartoffelknollen. Erstellt mit PAUP-SEARCH, 1070 Wiederholungen, Bootstrap-Werte an den wichtigsten Verzweigungen.

3.1.3 Auswahl der Inhibitorproteine zur funktionellen Analyse

Von jeder Gruppe wurden drei Klone für eine funktionelle Analyse ausgewählt. Dabei sollte die biologische Aktivität der Proteine bezüglich der Inhibierung von Invertase (insbesondere der Invertase-Inhibitor "Kandidaten" 1421.C und 1422.C) sowie der Inhibierung verschiedener Proteasen untersucht werden. Dazu wurden die Inhibitoren in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* als GST-Fusionproteine exprimiert. Kloniert wurden die Inhibitorgene ohne die für das Signalpeptid (Abb. 3.6, grau) codierenden DNA-Sequenzen. Aus den Gruppen wurden Vertreter ausgewählt, die zu verschiedenen Untergruppen gehörten. Dabei sollte untersucht werden, inwiefern sich Substitutionen von Aminosäuren (Abb. 3.6, farbig) in funktionellen Unterschieden widerspiegeln. Den aufgeführten Aminosäuresequenzen wurden homologe Sequenzen aus Datenbanken hinzugefügt: x56874 (Yamagishi *et al.*, 1991), ein Trypsin-Inhibitor aus *S. tuberosum* und p17979 (Strukelj *et al.*, 1992), ein Cathepsin D Inhibitor aus *S. tuberosum*. In Tabelle 3.2a wurden auf Aminosäureebene homologe Klone aufgelistet. P2B11.A und P4B1.B waren zu 100 % mit Klonen aus Datenbanken identisch. Die Klone der Gruppe A konnten dabei den Cathepsin D Inhibitoren zugeordnet werden, die der Gruppe C den Cystein Proteaseinhibitoren.

3.1.4 Sequenzmotive

Die zur weiteren Analyse ausgewählten Inhibitorklone (3.1.3) wurden auf Sequenzmotive hin untersucht (2.2.26). Dabei wurde in den Sequenzen von P2B11.A und P4B1.B eine potentielle N-Glycosylierungsstelle gefunden (N-S-S, Pos. 60 – 63). Alle Klone zeigten die Konsensussequenz [L, I, V, M]-x-D-x-[E, D, N, T, Y]-[D, G]-[R, K, H, D, E, N, Q]-x-[L, I, V, M]-x(5)-Y-x-[L, I, V, M] an Position 49 – 65, welche für Kunitz-Typ Inhibitoren typisch ist (Abb. 3.6). Eine Erkennungssequenz für den Transport des Proteins in die Vakuole wiesen die Inhibitoren P1E9.A, P2B11.A, P4B1.B, P1H5.B und P1D4.B an Position 30 – 36 auf. Diese Klone stimmten mit der Konsensussequenz N-P-I-x-L-P-S überein (Ishikawa *et al.*, 1994, Matsuoka *et al.*, 1990, Matsuoka und Nakamura, 1991), die anderen Inhibitoren wichen in jeweils einer Position davon ab.

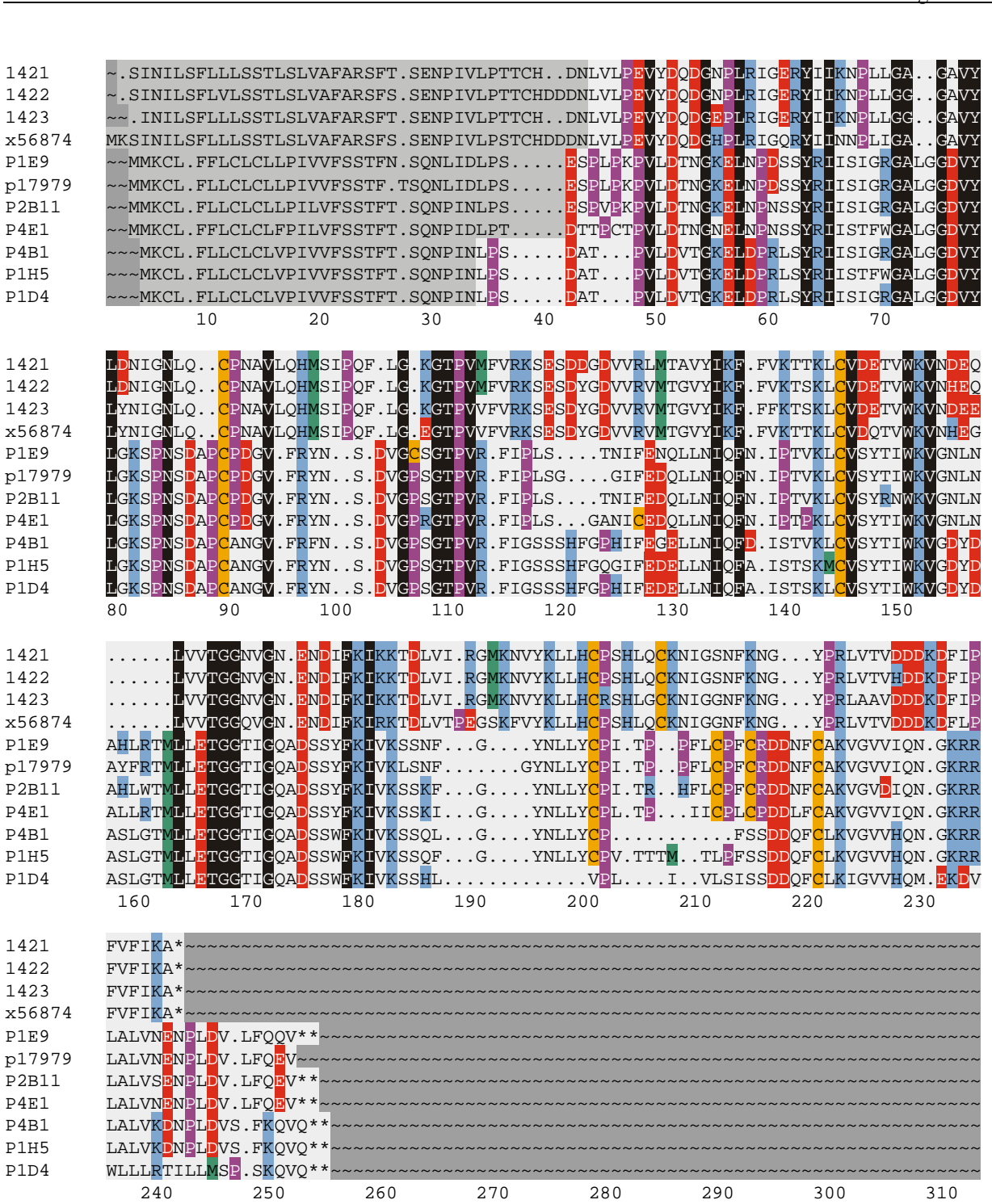


Abb. 3.6: Vergleich der zur Expression in *S. pombe* verwendeten Klone mit den Klonen x56874 (Cystein Proteaseinhibitor, *S. tuberosum*) und p17979 (Cathepsin D Inhibitor, *S. tuberosum*). Grau: Signalpeptide, schwarz: konservierte Aminosäuren aller Klone, rot: saure Aminosäuren, blau: basische Aminosäuren, orange: Cystein, grün: Methionin, violett: Prolin.

Tab. 3.2a: Vergleich der Inhibitorklone mit homologen Klonen aus Datenbanken.

<i>Klon</i>	Klon aus Datentbank	Homologie [%]	Inhibitortyp	Referenz
P1E9.A	p17979	95	Cathepsin D Inhibitor	Strukelj <i>et al.</i> 1990
P2B11.A	x62095	100	Cathepsin D Inhibitor	Strukelj <i>et al.</i> 1995
P4E1.A	jq2246	80	Cathepsin D Inhibitor	Hannapel 1994
P1D4.B	t07414	97	Kunitz-Typ Proteaseinhibitor	Ishikawa <i>et al.</i> 1994
P1H5.B	t07414	95	Kunitz-Typ Proteaseinhibitor	Ishikawa <i>et al.</i> 1994
P4B1.B	t07414	100	Kunitz-Typ Proteaseinhibitor	Ishikawa <i>et al.</i> 1994
1421.C	t07750	85	Cystein Protease- inhibitor	Gruden <i>et al.</i> 1997
1422.C	t07750	89	Cystein Protease- inhibitor	Gruden <i>et al.</i> 1997
1423.C	t07750	87	Cystein Protease- inhibitor	Gruden <i>et al.</i> 1997

3.1.5 Invertase-Inhibitorklone

Die von Dr. H. Glaczinski isolierten Invertase-Inhibitorklone 1421.C und 1422.C wurden mit den Inhibitorsequenzen aus der EST-Bibliothek verglichen. Dabei wurden sechs weitere Klone gefunden, welche Merkmale aufwiesen, die als Kriterien zur Festlegung auf die "Kandidaten" 1421.C und 1422.C dienten (Abb. 3.7). Diese waren Lysin in der Position 98, Methionin in den Positionen 103 und 173, Tyrosin oder Asparaginsäure in der Position 112 sowie Asparagin in der Position 175, welche durch partielle Sequenzierungen der Aminosäuresequenzen interner Peptide nach Bromcyanspaltung des nativen Proteins ermittelt worden waren (Dr. H. Glaczinski, unveröffentlichte Daten). Die Sequenzen von P3C3.C, P3C4.C und S5E6.C waren am C-Terminus unvollständig. Untereinander waren die Inhibitoren auf Aminosäureebene zu mindestens 97 % identisch. P9B1.C und P9B4.C hatten wie 1421.C an Position 144 einen Asparaginsäurerest, die übrigen wie 1422.C Histidin. An Position 113 stand bei P4G5.C Arginin anstelle von Glycin, bei P9B4.C an Position 189 Glutaminsäure statt Lysin und bei

P3C4.C wurde Serin an Position 193 durch Arginin substituiert. Zwischen den Positionen 209 und 213 war ein Abschnitt mit variierenden sauren und basischen Aminosäuren zu erkennen.

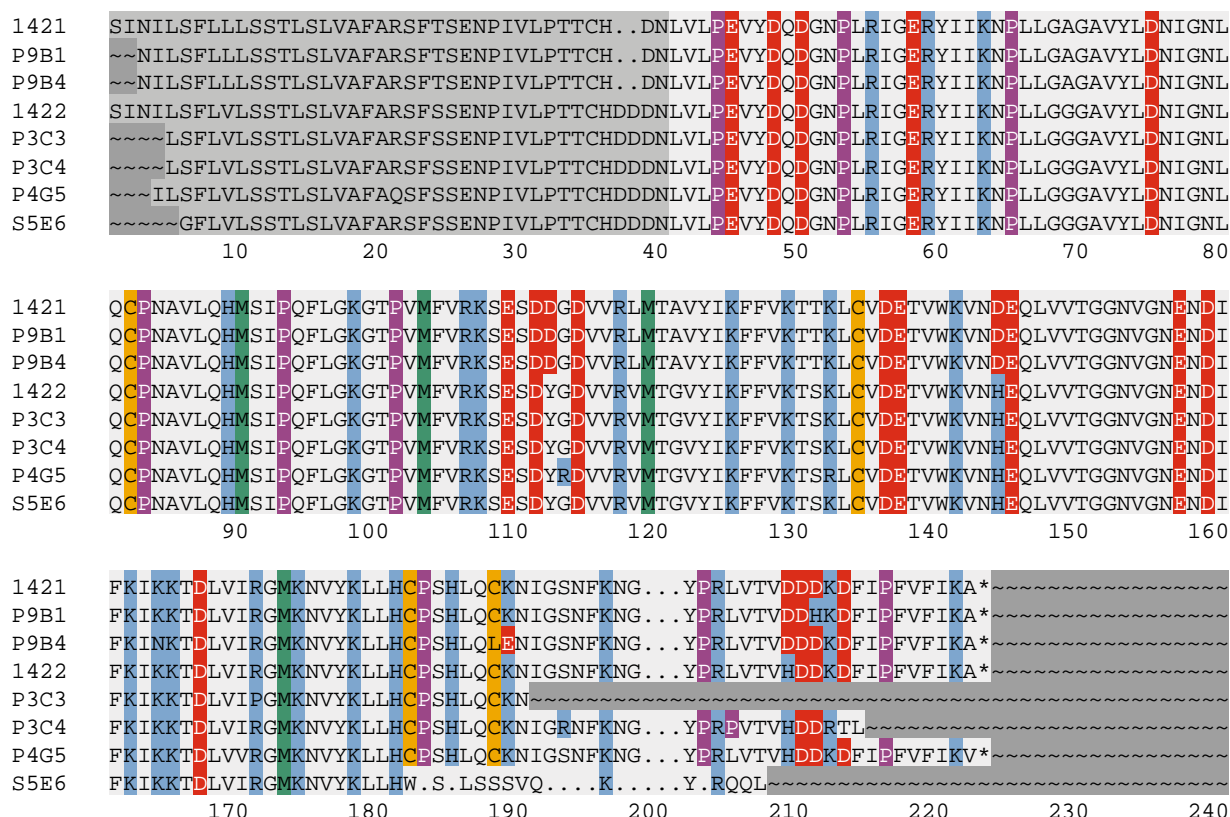


Abb. 3.7: Vergleich von möglichen Invertase-Inhibitoren. Grau: Signalpeptid, rot: saure Aminosäuren, blau: basische Aminosäuren, grün: Methionin, orange: Cystein, violett: Prolin.

3.1.6 Biochemische Merkmale der Inhibitorproteine

Mithilfe von Computerprogrammen (2.2.26) wurden ausgehend von den aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen die in *Tabelle 3.2b* aufgeführten biochemischen Daten der Inhibitorproteine berechnet. Die isoelektrischen Punkte (pI) der Inhibitoren der Gruppe B lagen dabei im sauren Bereich ($pH\ 5,2 - 6,3$), die der Gruppe C im alkalischen Bereich ($pH\ 8,3 - 8,6$). Inhibitoren der Gruppe A hatten vorwiegend einen alkalischen pI (P2B11.A, P1E9.A). Für den Inhibitor P4E1.A wurde ein pI von 5,4 berechnet, worin er der

Gruppe B ähnlich war. Aufgrund der Sequenzanalyse wurde er jedoch der Gruppe A zugeordnet. *Tabelle 3.3* zeigt die Aminosäurekomposition der Inhibitorklone. Die Klone der Gruppe A (inkl. P4E1.A) unterschieden sich durch einen niedrigeren Asparaginsäuregehalt (D) sowie höhere Anteile an Cystein (C) und Prolin (P) von den anderen Gruppen. Gruppe B weist einen geringeren Asparagingehalt (N) auf, Gruppe C höhere Anteile an Lysin (K), Methionin (M) und Valin (V). Der Serinanteil (S) schwankt innerhalb der Gruppen geringfügig, zwischen den Gruppen lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. In Gruppe A ist er doppelt, in Gruppe A viermal so hoch wie in Gruppe C.

Tab. 3.2b: Biochemische Merkmale der zur Expression in *S. pombe* verwendeten Inhibitorklone.

Klon	Molekulargewicht (ohne Signalpeptid)	pI	(-)Reste (D + E)	(+)Reste (R + K)	Amino- säuren	Gruppe
P2B11	20804.7	8.26	17	19	188	A
P1E9	20635.6	8.21	15	17	188	A
P4E1	20783.9	5.39	16	15	191	A/B
P1D4	19948.2	5.21	18	13	184	B
P1H5	20996.8	5.62	18	16	193	B
P4B1	20022.7	6.32	18	17	185	B
1421	20118.4	8.32	20	22	179	C
1422	20154.5	8.99	17	22	179	C
1423	20090.3	8.61	20	23	179	C

Tab. 3.3: Aminosäurekomposition der zur Expression in *S. pombe* verwendeten Inhibitorklone, Aminosäurezusammensetzung abgeleitet von DNA-Sequenz.

Klon	Aminosäurekomposition [%]																				Gruppe
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
P2B11	3.2	4.8	8	5.9	3.2	2.7	3.2	8.5	1.1	5.9	10.1	5.3	0.5	5.3	7.4	8	4.3	1.1	3.7	8	A
P1E9	3.2	4.3	8.5	5.3	3.7	3.2	2.7	8.5	0.5	6.4	10.6	4.8	0.5	5.3	8	7.4	4.8	0.5	3.7	8	A
P4E1	3.7	3.7	7.9	5.8	4.2	2.6	2.6	8.4	0	6.8	12	4.2	0.5	3.7	8.9	6.3	6.8	1	3.7	7.3	A/B
P1D4	3.8	3.3	2.2	7.1	1.6	2.7	2.7	9.2	2.2	7.6	10.9	3.8	1.6	3.8	5.4	12.5	4.9	1.6	2.7	7.1	B
P1H5	4.1	3.1	3.6	7.3	2.1	4.1	2.1	9.8	1	4.7	9.3	5.2	1.6	5.7	5.2	10.9	6.7	1.6	3.6	8.3	B
P4B1	3.8	3.8	3.8	7.6	2.2	3.8	2.2	10.8	1.6	5.4	10.3	5.4	0.5	5.4	5.4	10.8	4.3	1.1	3.2	8.6	B
1421	2.8	3.4	7.3	7.8	2.2	3.4	3.4	7.8	1.7	6.7	9.5	8.9	2.2	5	5	2.8	4.5	0.6	3.4	11.7	C
1422	1.7	3.4	7.3	6.1	2.2	3.4	3.4	8.9	2.8	6.7	8.9	8.9	2.2	5	5	3.4	3.9	0.6	3.9	12.3	C
1423	2.8	3.9	6.7	6.7	2.2	2.2	4.5	10.1	1.7	6.7	8.9	8.9	1.7	5.6	4.5	2.8	3.4	0.6	4.5	11.7	C

3.2 Expression und Aufreinigung von Inhibitorproteinen in einem heterologen System

3.2.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in *S. pombe*

Zum Nachweis der Invertase inhibierenden Aktivität der Proteine 1421.C bzw. 1422.C *in vitro* wurden diese als GST-Fusionsproteine in dem eukaryotischen Expressionssystem *S. pombe* exprimiert. Ebenso wurden die Proteine 1423.C, P1D4.B, P1E9.A, P1H5.B, P2B11.A, P4B1.B und P4E1.A als GST-Fusionsproteine exprimiert um sie zusammen mit 1421.C und 1422.C auf Protease inhibierende Aktivität hin zu untersuchen. Die Gene der Inhibitorproteine wurden dazu in die "Ligase Independent Cloning Site" des Vektors pESP2 kloniert (2.2.5). Durch PCR-Reaktionen mit konstruktsspezifischen Primern wurde das Vorhandensein des Gens im Vektor in der richtigen Position überprüft. Das Expressionskonstrukt stand unter der Kontrolle des *nmt1* Promoters, der bei einer Thiaminkonzentration unterhalb 5 μ M induziert wurde. Glutathion-S-Transferase war N-terminal an das jeweilige Inhibitorprotein gekoppelt. Es wurde zunächst ein "Small Scale" Induktionsversuch durchgeführt (2.2.17). Dabei wurden von jedem Klon zwei Hauptkulturen angesetzt. In einer wurde die Proteinexpression durch thiaminfreies Medium induziert, in der anderen wurde sie durch 25 μ M Thiamin reprimiert. Eine Probe jedes Ansatzes wurde wie beschrieben vorbereitet und auf einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und mit "Coomassie Brilliant Blue" gefärbt. Die *Abbildungen* 3.8 und 3.9 zeigen Vergleiche des Gesamtproteins von induzierten und nicht induzierten Ansätzen. Das Kontrollprotein GST-C zeigte eine deutliche Bande bei 39 kD (27 kD-GST-Protein + 12 kD-Kontrollprotein), die Fusionsproteine GST-1421.C, GST-1422.C, GST-1423.C, GST-P1E9.A, GST-P1D4.B und GST-P4B1.B zeigten Banden bei 47 – 48 kD (27 kD-GST-Protein + 20-21 kD-Inhibitorprotein). Für die Klone P1H5.B und P4E1.A konnte ebenfalls die Synthese von Fusionsprotein nachgewiesen werden. Die nichtinduzierten Kontrollansätze zeigten keine Banden bei 47 – 48 kD. Der induzierte Klon P2B11.A zeigte auf der denaturierenden SDS-PAGE bei Färbung mit "Coomassie Brilliant Blue" keine entsprechende Bande, konnte jedoch durch Immunodetektion mithilfe eines monoklonalen Anti-FLAG™ Antikörpers nachgewiesen werden (*Abb. 3.10*).

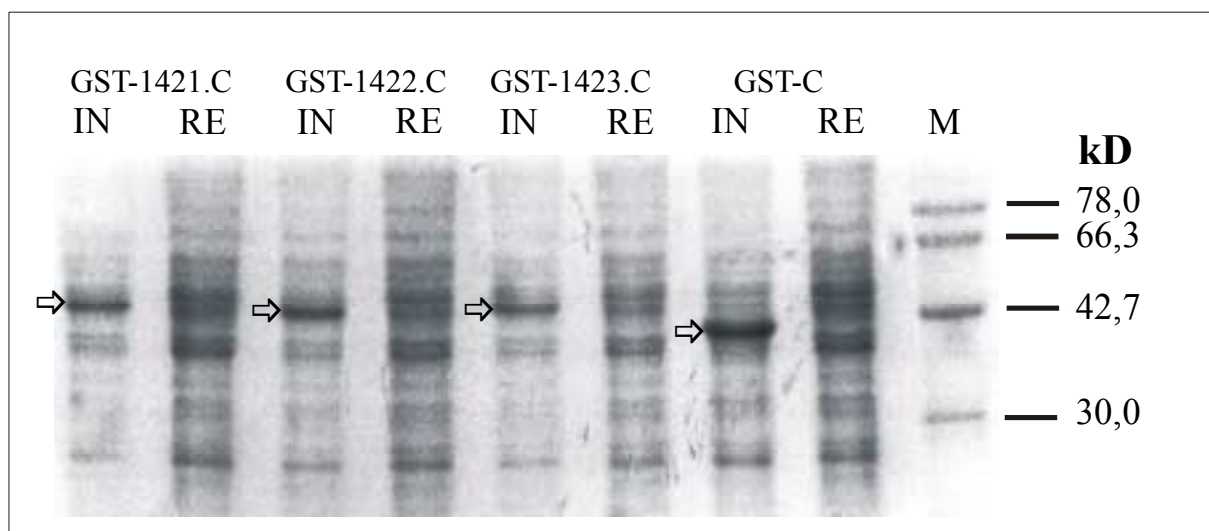


Abb. 3.8: Denaturierende SDS-PAGE mit Gesamtprotein aus Zellaufschlüssen GST-1421.C, GST-1422.C, GST-1423.C, Kontrollprotein C. IN = Proteinexpression induziert, RE = reprimiert, M = Marker, Pfeile = Fusionsproteinbanden.

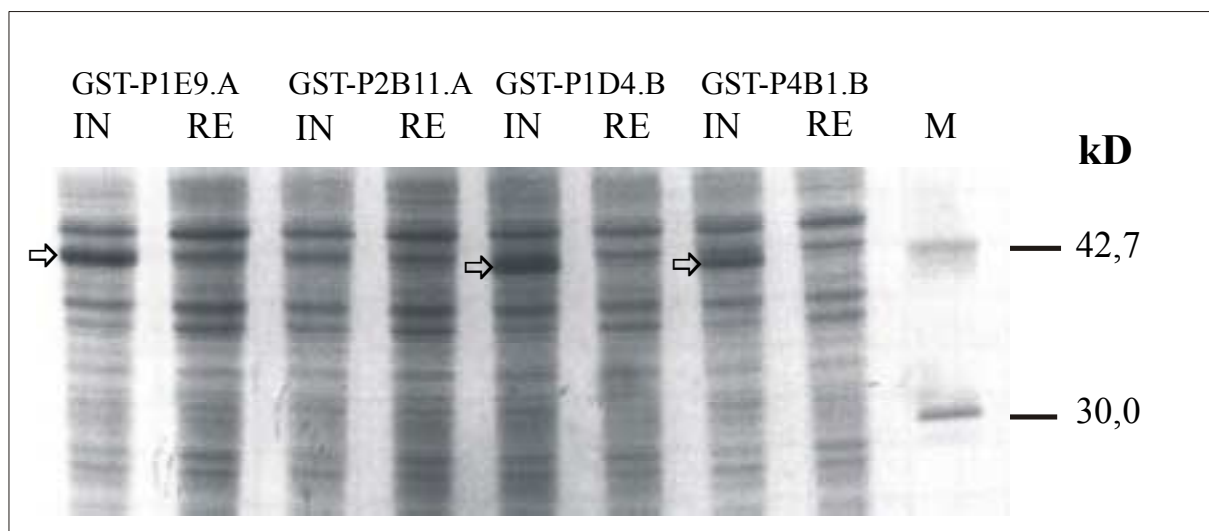


Abb. 3.9: Denaturierende SDS-PAGE mit Gesamtprotein aus Zellaufschlüssen GST-P1E9.A, GST-P2B11.A, GST-P1D4.B, GST-P4B1.B. IN = Proteinexpression induziert, RE = reprimiert, M = Marker, Pfeile = Fusionsproteinbanden.

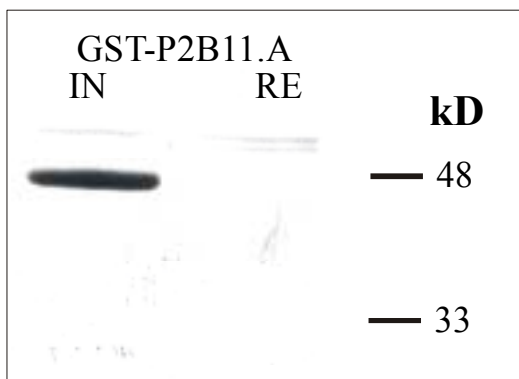


Abb. 3.10: Western-Blot Analyse von Gesamtprotein aus Zellaufschlüssen von induziertem (IN) und reprimiertem (RE) Klon P2B11.A.

3.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie

Zur Herstellung größerer Mengen GST-Fusionsproteins wurde die Induktion der Expression im 1 L-Maßstab ("Large Scale", 2.2.17) durchgeführt. Die Hefezellen wurden nach dem Abtrennen vom Medium mechanisch mit Glasperlen zerstört. Aus dem Aufschluss wurde ein klarer Extrakt des Gesamtproteins hergestellt (2.2.18.1). Dieser wurde mittels einer FPLC-Säule mit "GST Affinity Resin" aufgereinigt. Dabei wurde das GST-Tag des Fusionsproteins an das auf der Gelmatrix immobilisierte reduzierte Glutathion gebunden und nach einem Waschschrift durch einen Puffer mit gelöstem reduzierten Glutathion eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.11). Das Fusionsprotein GST-P1H5.B zeigte dabei neben der 48 kD-Bande noch eine weitere schwächere Bande bei 26 kD. Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden durch Ultrafiltration fünffach konzentriert. Abbildung 3.12 zeigt eine denaturierende SDS-PAGE von Proben der einzelnen Schritte der Aufreinigung des Fusionsproteins GST-P4E1.A. Die Fusionsproteinbande ist auch hier sehr intensiv, weitere Banden sind nur in geringem Maße vorhanden. Die Bandenmuster zusätzlicher Banden sind für die Fusionsproteine GST-P2B11.A, GST-P4B1.B, GST-P1D4.B und GST-P1E9.A ähnlich den vorherigen, GST-1423.C zeigt zwei bis drei weitere Banden bei 30 – 32 kD (Abb. 3.13). Fusionsproteine, die auf Invertase inhibierende Aktivität untersucht werden sollten (GST-1421.C, GST-1422.C) wurden durch Dialyse in 50 mM Acetatpuffer pH 4,6 überführt. Für die Untersuchung auf Protease inhibierende Aktivität wurden 20 mM Tris · HCl und 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, verwendet.

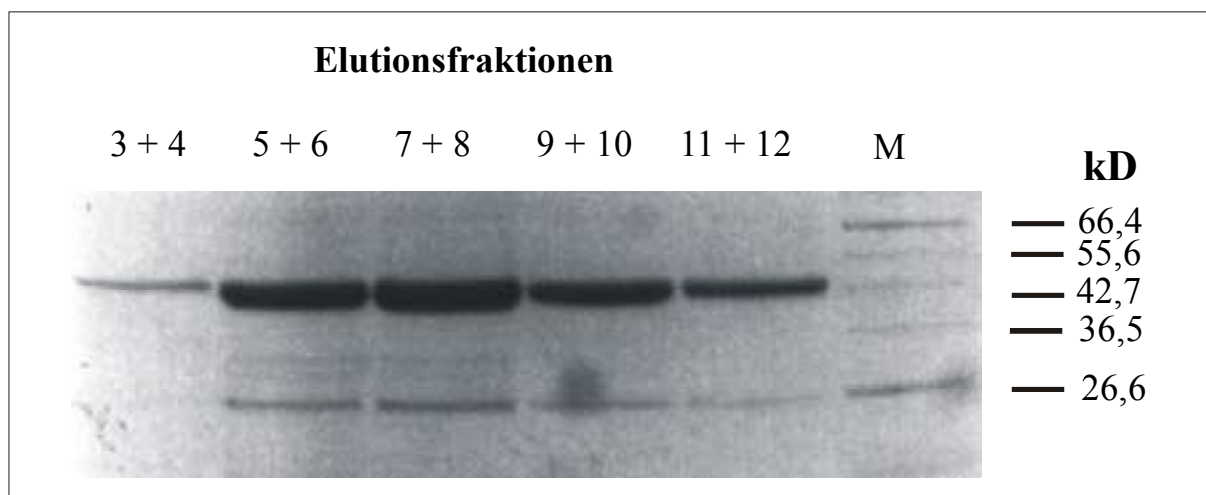


Abb. 3.11: Elution des Fusionsproteins GST-P1H5.B. Denaturierende SDS-PAGE mit 20 μ L je Spur aus 2 mL Elutionsfraktionen, M = Marker.

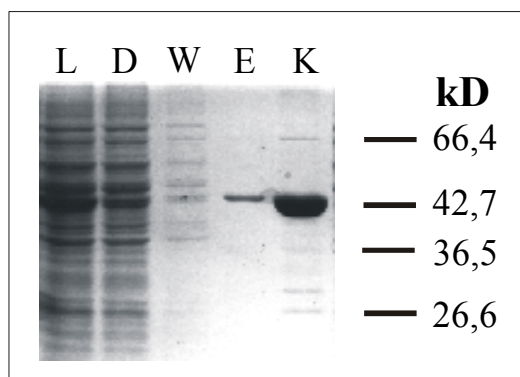


Abb. 3.12: Affinitätschromatographische Aufreinigung des Fusionsproteins GST-P4E1.A. L = Lysat, D = Durchfluss, W = Waschpuffer, E = gesamte Elutionsfraktionen, K = Konzentrat der Elutionsfraktionen.

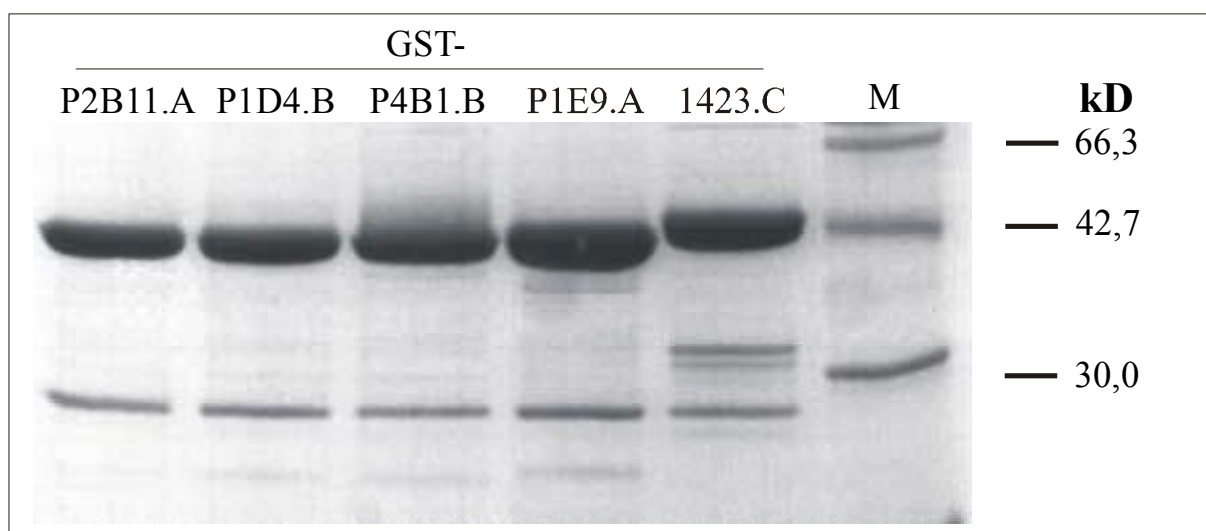


Abb. 3.13: Denaturierende SDS-PAGE der Fusionsproteinkonzentrate, M = Marker.

3.2.3 Spaltung von GST-Fusionsproteinen durch Enterokinase

Inhibitorprotein und GST-Tag wurden durch ein kurzes FLAGTM-Peptid mit der Aminosäuresequenz D-Y-K-D-D-D-D-K verbunden, in dem sich die Enterokinase-Schnittstelle D-D-D-D-K befand. Durch Behandlung mit Enterokinase wurden die GST-Tags der Proteine 1421.C, 1422.C und P1H5.B abgespalten (2.2.20). Dazu wurden die Proteine in Enterokinase-Reaktionspuffer bei RT 16 h lang mit Enterokinase inkubiert. Zum Vergleich wurde die Reaktion auch bei 4°C durchgeführt, was jedoch zu keiner Spaltung der Fusionsproteine führte. Freigesetztes GST-Tag wurde mithilfe von "GST Affinity Resin" entfernt. Enterokinase wurde der Lösung durch STI-Agarose, die das Enzym mit hoher Affinität bindet, entzogen. Das Fusionsprotein GST-1421.C wurde durch Enterokinase in ein 27 kD sowie ein 21 – 22 kD großes Protein gespalten (*Abb. 3.14*, Spur 3). "GST Affinity Resin" und STI-Agarose wurden nach der Aufreinigung in GST-Elutionspuffer aufgenommen und ebenfalls auf der denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Hier war nur eine 27 kD große Bande erkennbar, die dem GST-Tag entsprach (Spur 4). Auf einem weiteren Gel wurde der Überstand der Aufreinigung aufgetrennt, der eine sehr starke Bande bei 21 – 22 kD zeigte, die der Größe des 1421.C-Proteins entsprach sowie in geringerer Stärke die 27 kD-Bande (Spur 6). In gleicher Weise wurde auch das Fusionsprotein GST-P1H5.B behandelt, die Ergebnisse entsprachen denen von GST-1421.C (nicht gezeigt). Bei der Spaltung von GST-1422.C war nach der Aufreinigung nur eine schwache Bande von 21 – 22 kD festzustellen (nicht gezeigt). Durch Dialyse gegen 50 mM Acetatpuffer pH 4,6 (GST-1421.C, GST-1422.C) und 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (GST-P1H5.B) wurden die Proteine in die entsprechenden Puffer für Versuche auf inhibierende Aktivität von Invertase oder Proteasen überführt.

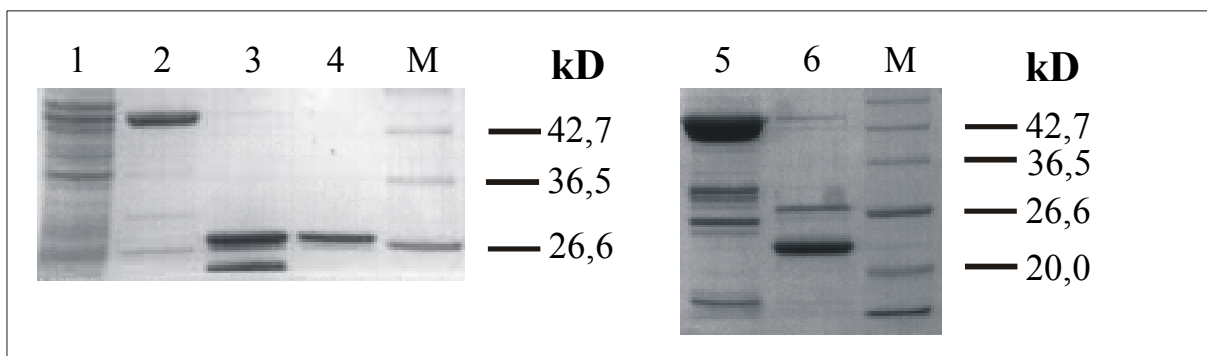


Abb. 3.14 (vorherige Seite): Enterokinase-Spaltung von GST-1421.C. 1 = Gesamtprotein des Zelllysats, 2, 5 = Proteinkonzentrat, 3 = Spaltansatz, 4 = GST-Tag, 6 = 1421.C-Protein, M = Marker.

3.2.4 Expression von His-Tag Fusionsproteinen in *S. pombe*

Da die Proteine 1421.C und 1422.C als GST-Fusionsproteine keine Invertase inhibierende Aktivität gezeigt hatten (3.3.1), wurden sie als Fusionsproteine mit His-Tag exprimiert um sie auf entsprechende Aktivität hin zu überprüfen. Auch die jeweiligen Enterokinase-Spaltprodukte zeigten keine Aktivität. Zudem lag das vom GST-Tag abgespaltene Protein 1422.C nur in geringer Konzentration vor und war instabil. 1421.C und 1422.C wurden daher als Fusionsproteine mit His-Tag exprimiert, da dieses Tag sehr klein ist (6 Histidinreste) und Störungen der Inhibitorreaktion durch einen großen Fusionspartner somit als weniger wahrscheinlich angesehen wurden. Zudem konnten hier die Fusionsproteine (theoretisch) durch einen Wechsel zu einem sauren (pH 4 – 5) Waschpuffer von der Gelmatrix der Säule eluiert werden, so dass nur für die Bindung an die Matrix ein pH-Wert von 8,0 eingestellt werden musste. Der native Invertaseinhibitor aus Karoffelknollen wurde in beschriebenen Methoden ebenfalls in einem sauren pH-Bereich aufgereinigt (Bracho und Whitaker, 1990, Ewing *et al.*, 1971, Pressey 1966, 1967, 1968).

Die in pBluescript klonierten Gene *1421.C* und *1422.C* wurden mit PCR-Reaktionen amplifiziert (2.2.4) und dabei die für His-Tags codierenden DNA-Sequenzen angebunden. Dabei wurden Klone mit His-Tag am C-Terminus (1421.C/22.C-His) sowie am N-Terminus (His-1421.C/22.C) der resultierenden Aminosäuresequenz hergestellt. Die Klonierung in das Plasmid pREP3X (2.2.6) wurde wie die Transformation von *S. pombe* durch eine für das Expressionskonstrukt spezifische PCR sowie durch Sequenzierung verifiziert. Die Proteinexpression wurde wie bei Klonen mit pESP2 durch thiaminfreies Medium induziert. Es wurde wieder zunächst ein "Small Scale" Induktionsversuch durchgeführt mit reprimierten Ansätzen als Kontrollen. Die Auftrennung auf einer denaturierenden SDS-PAGE zeigte deutlich eine Bande mit einer Größe von 22 kD bei den His-1422.C-Klonen, welche bei den entsprechenden reprimierten Kontrollen nicht festzustellen war (*Abb. 3.15*). Bei den induzierten His-1421.C-Klonen war ebenfalls eine Bande festzustellen, die in dieser Intensität bei den

reprimierten Kontrollen nicht vorhanden war, auf dem Gel jedoch etwas größer erschien als His-1422.C und auf gleicher Höhe wie eine hefeeigene Bande lief. Die induzierten Klone mit C-terminalem His-Tag zeigten keinen Unterschied zu den Kontrollen (in Abb. 3.15 nur gezeigt für 1421.C-His). Zur eindeutigen Klärung, ob die jeweiligen Klone das erwartete Fusionsprotein produzierten, wurde eine Immunodetektion mit einem monoklonalen Anti-His Antiserum durchgeführt. Abbildung 3.16 zeigt, dass bei His-1421.C und His-1422.C eine entsprechende Bande detektiert wird, während die reprimierten Kontrollen keine Bande zeigen. In den Zelllysaten der Klone mit C-terminalem His-Tag konnte auch in der Western-Blot Analyse kein Fusionsprotein nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

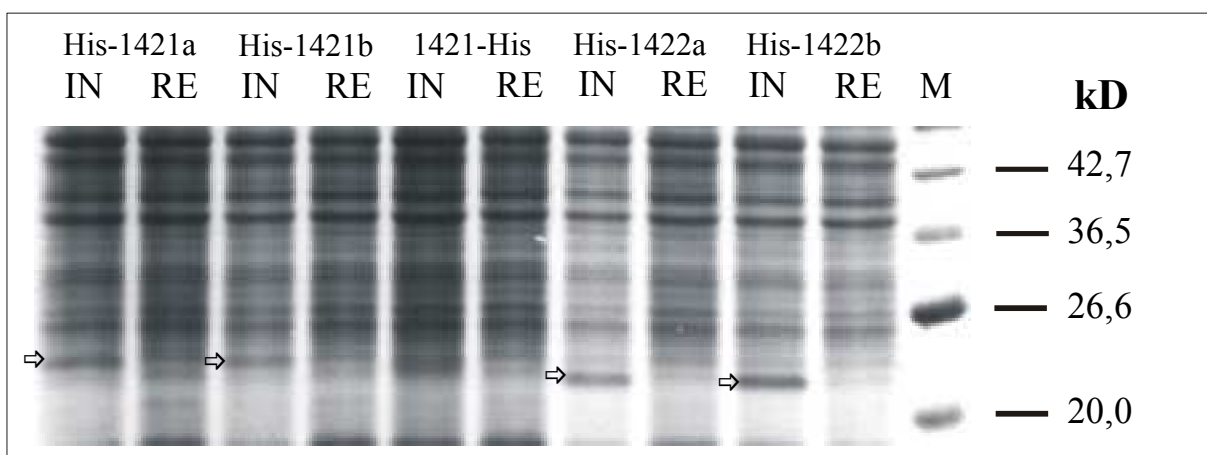


Abb. 3.15: Expression von His-Tag Proteinen 1421.C und 1422.C in *S. pombe*. IN = induzierte, RE = reprimierte Klone, Pfeile = Fusionsproteinbanden.

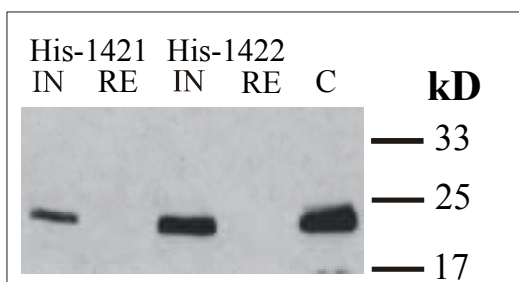


Abb. 3.16: Western-Blot Analyse von induzierten (IN) und reprimierten (RE) Klonen His-1421.C und His-1422.C. C = Kontrolle mit aufgereinigtem His-Tag Protein.

3.2.5 Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie

Zur präparativen Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen wurde eine "Large Scale" Induktion der Proteinexpression mit dem Klon His-1422.C durchgeführt (2.2.17). Die

Hefezellen wurden mithilfe von Glasperlen aufgeschlossen und es wurde ein klarer Extrakt des Gesamtproteins hergestellt (2.2.18.2). Aus diesem wurden die His-Tag Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Superflow Matrix aufgereinigt. Dabei sollten die Histidinreste der Tags an auf der Gelmatrix immobilisierten Nickelionen binden. Zunächst wurde eine native Aufreinigungsmethode verwendet. Dabei sollte das an die Gelmatrix gebundene Fusionsprotein durch Imidazol, welches eine höhere Affinität zu den gebundenen Nickelionen hat als die Imidazolringe der Histidinreste, eluiert werden. Die Bindung an die Gelmatrix erfolgte bei pH 8,0. Parallel zur Elution mit Imidazol wurde eine Ablösung des Fusionsproteins durch Absenkung des pH-Wertes im Waschpuffer auf 4,5 versucht. Eine Analyse der Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen der Chromatographie in einer denaturierenden SDS-PAGE zeigte, dass keines der rekombinanten Proteine an der Matrix gebunden wurde. Nachfolgend wurde eine denaturierende Aufreinigungsmethode angewendet (2.2.18.3). Dabei wurden die Proteine durch 8 M Harnstoff denaturiert. *Abbildung 3.17* zeigt, dass die im Zelllysate (L) vorhandene Fusionsproteinbande im Durchfluss (D) und Waschpuffer (W) durch Coomassie-Färbung nicht nachweisbar war. In den Elutionsfraktionen E2 – E4 war das erwartete Protein von 22 kD deutlich zu erkennen. Mit den Elutionsfraktionen E2 und E3 wurden Renaturierungsversuche unternommen. Auch die Western-Blot Analyse einiger Fraktionen (*Abb. 3.18*) zeigte diese Bande. Aufgrund der höheren Sensitivität der Nachweismethode gegenüber der Coomassie-Färbung konnte hier das Fusionsprotein auch in D, W2 und E1 nachgewiesen werden. Außerdem war auch noch insbesondere im Lysat eine kleinere Bande zu erkennen, die wohl auf Abbauprodukte des Fusionsproteins zurückzuführen ist.

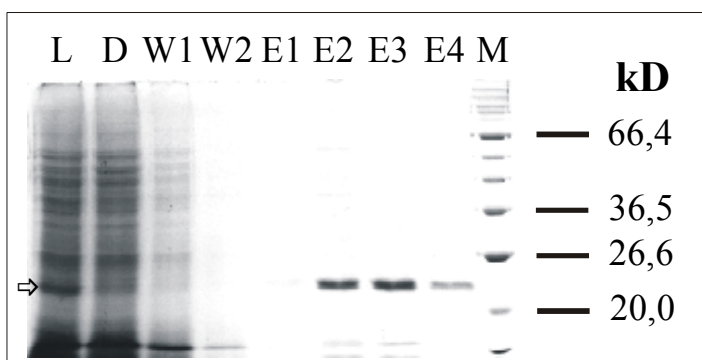


Abb. 3.17: SDS-PAGE, denaturierende Aufreinigung von His-1422.C. L = Lysat, D = Durchfluss, W1, 2 = Waschfraktionen, E1 – 4 = Elutionsfraktionen, M = Marker. Pfeil = Fusionsproteinbande.

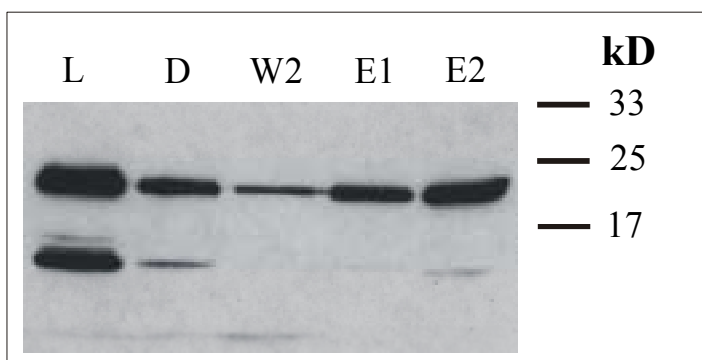


Abb. 3.18: Western-Blot Analyse von Fraktionen der denaturierenden Aufreinigung von His-1422.C. Bezeichnungen s. *Abb. 3.17*.

3.2.6 Renaturierung von Fusionsproteinen mit His-Tag

Zunächst wurde versucht, an die Ni-NTA-Gelmatrix gebundenes His-Tag Fusionsprotein zu renaturieren und dann zu eluieren. Dazu wurde das unter denaturierenden Bedingungen hergestellte Lysat (2.2.18.3) mit "Ni-NTA Resin" inkubiert und das gebundene Protein anschließend in einer Säule gewaschen. Die Konzentration des im Waschpuffer enthaltenen Harnstoffes wurde dabei stufenweise reduziert (2.2.19). Durch das Vorhandensein des Redoxpaares GSH und GSSG in einem Verhältnis von 10 : 1 (bei einer GSH-Konzentration von 2,5 mM) sollte das notwendige Oxidationspotential zur Herstellung und Spaltung von Disulfidbrücken in Faltungsintermediaten erzeugt werden. Zum Ablauf dieser Reaktionen und zur Bindung des Fusionsproteins an der Gelmatrix war ein pH-Wert von 8,0 erforderlich. Nach der Entfernung des Harnstoffes aus dem Waschpuffer wurde die Säule noch mit Natriumphosphatpuffer mit GSH und GSSG gewaschen. Zur Elution wurde der Elutionspuffer zur nativen Aufreinigung (pH 4,9, 2.2.18.1) verwendet. Die Analyse aller Fraktionen in einer denaturierenden SDS-PAGE zeigte, dass in keiner das 22 kD-Fusionsprotein vorlag. In einer denaturierten Probe der verwendeten Gelmatrix konnte das Protein nachgewiesen werden (*Abb. 3.19*, Spur 1). Es wurde also nicht von der Säule eluiert.

Alternativ wurde versucht, das in den Elutionsfraktionen der denaturierenden Aufreinigung gelöste Protein zu renaturieren (2.2.19). Dazu wurden die Fraktionen mit Argininpuffer verdünnt. Durch die Verdünnung auf 50 µg/mL sollte eine Aggregation der Proteine während der Renaturierung vermieden werden, Arginin (100 mM) sollte zur Stabilisierung beitragen. Auch hier wurde das Redoxpaar GSH / GSSG zugesetzt. Durch Dialyse gegen Argininpuffer wurde der Harnstoff aus der Proteinlösung entfernt. Dabei bildete sich eine geringe Menge

Niederschlag, der durch Zentrifugation entfernt wurde. Der Überstand wurde nach Konzentrierung durch Ultrafiltration gegen Acetatpuffer pH 4,6 dialysiert, um das aufgereinigte Fusionsprotein anschließend auf Invertase inhibierende Aktivität zu überprüfen. Während der Dialyse wurde die Lösung leicht trüb. Eine Analyse des Dialysates auf einer denaturierenden SDS-PAGE zeigte die Fusionsproteinbande bei 22 kD (Abb. 3.19, Spur 2).

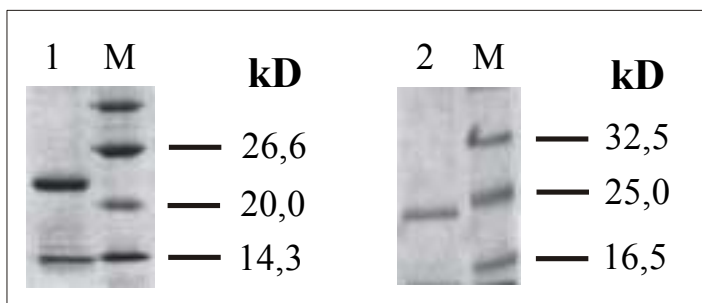


Abb. 3.19: SDS-PAGE mit Proben der denaturierten Gelmatrix aus der "Säulenrenaturierung", 1, des Dialysates aus der Renaturierung durch Dialyse, 2. M = Marker.

3.3 Funktionelle Analyse rekombinanter Inhibitorproteine

3.3.1 Inhibierung von Invertase

Die verschiedenen aufgereinigten rekombinanten Proteine der Klone *1421.C* und *1422.C* wurden auf Invertase inhibierende Aktivität überprüft. Alle Versuche wurden mit affinitätschromatographisch aufgereinigter Invertase aus Kartoffelknollen ("Granola", 2.2.21.2) durchgeführt. In Kontrollversuchen wurden mit einer von Dr. Ch. Gebhardt aufgereinigten Fraktion des Invertase-Inhibitors gearbeitet.

Die GST-Fusionsproteine GST-1421.C und GST-1422.C sowie deren Enterokinase-Spaltprodukte zeigten keine Inhibierung von Invertase. Als problematisch erwies es sich zudem, dass alle verwendeten Tests auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern bereits durch geringe Konzentrationen an freiem Glutathion gestört wurden (2.2.22.1). Bei der Testreaktion nach Nelson und Somogyi bildete sich beim Aufkochen der Proben ein orangefarbener Niederschlag, welcher unlöslich blieb und auch durch Zentrifugation nicht vollständig entfernt werden konnte. Die Lösungen blieben trüb und waren für eine photometrische Messung ungeeignet. In den Testreaktionen mit Glucoseoxidase und Peroxidase sowie bei der UV-

Testmethode der Firma Roche sorgten Redoxreaktionen des GSH mit o-Dianisidin oder NADP⁺ für starke Störeffekte. Dies wurde in Kontrollreaktionen mit GSH-Verdünnungen gezeigt. Dadurch wurden lange Dialysezeiten erforderlich, um das Glutathion vollständig zu entfernen. Auch nach der Dialyse inhibierte keines der Proteine Invertase. In einer denaturierenden SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass die Proteine nicht abgebaut worden waren. In Kontrollreaktionen mit dem aufgereinigten nativen Invertase-Inhibitor wurde die Kartoffelinvertase vollständig inhibiert, bei Hefeinvertase zeigte der Inhibitor keinen Effekt. Von den GST-Fusionsproteinen sowie Enterokinase-Spaltprodukten waren 5 – 100 µg Protein je Reaktionsansatz eingesetzt worden.

Auch für das His-Tag Fusionsprotein His-1422.C aus dem Renaturierungsversuch konnte keine Inhibierung von Invertase gezeigt werden. Dazu wurden 5 – 50 µg Protein je Ansatz verwendet und mithilfe des Glucoseoxidase- / Peroxidasetests überprüft. Auch das an die Gelmatrix gebundene Fusionsprotein zeigte keine Inhibierung.

Weiterhin wurden Zelllysate von induzierten Inhibitorclonen gegen H₂O dialysiert und ohne weitere Aufreinigung in den Testreaktionen eingesetzt. Der hohe Umsatz des Saccharosesubstrates durch Hefeinvertase machte jedoch eine Messung inhibitorischer Aktivität unmöglich.

3.3.2 Inhibierung von Proteasen durch GST-Fusionproteine

Die Fusionsproteine GST-1421.C, -1422.C, -1423.C, -P1D4.B, -P2B11.A, -P1E9.A, -P1H5.B, -P4B1.B und -P4E1.A wurden auf Inhibierung der Serinproteasen α -Chymotrypsin, Subtilisin und Trypsin, der Aspartatproteasen Aspergillopepsin I und Pepsin A sowie der Cysteinprotease Papain getestet. Es wurden dabei die in 2.2.22.2 beschriebenen Methoden zur Bestimmung der relativen Proteaseaktivität angewendet. In den Testansätzen wurden 0,5 – 100 µg Fusionsprotein eingesetzt (wenn eine ausreichende Menge des Fusionsproteins vorhanden war) und jeweils mindestens zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Es wurden aus jeder der Inhibitorgruppen jeweils drei Vertreter ausgewählt: GST-P1E9, GST-P2B11 und GST-P4E1 aus der Gruppe A, GST-P1D4, GST-P1H5 und GST-P4B1 aus der Gruppe B sowie GST-1421, GST-1422 und GST-1423 aus der Gruppe C. Die Versuche zur Inhibierung von Trypsin (*Abb.*

3.20) zeigten, dass die ausgewählten Vertreter der Gruppe B sowie GST-P1E9.A die Protease zu 80 – 95 % inhibierten. Dabei war bei den Inhibitoren der Gruppe B auch der Anstieg der Inhibierung bei zunehmender Fusionsproteinmenge ähnlich hoch. Die Inhibitoren der Gruppe C sowie GST-P2B11.A erreichten Inhibitionswerte von 30 – 50 %.

α -Chymotrypsin wurde durch das Fusionsprotein GST-P1H5.B zu 80 % inhibiert, von GST-P4E1.A zu 65 % (*Abb. 3.21*). Da die Proteinmenge nicht ausreichte, wurde bei GST-P4E1.A auf den Einsatz von 10 μg Fusionsprotein / μg Protease verzichtet. Alle übrigen getesteten Inhibitoren zeigten höchstens 15 % Inhibition.

Papain wurde von GST-P1D4.B und GST-P4B1.B zu 37 – 40 % und von GST-P1H5.B sowie GST-P2B11.A zu 30 – 32 % inhibiert (*Abb. 3.22*). Da von GST-P1E9.A keine ausreichende Menge Protein vorhanden war, wurden hier höchstens 5 μg Fusionsprotein / μg Papain eingesetzt. Bei dieser Konzentration wurde eine Inhibierung von 24 % erreicht. GST-P4E1.A inhibierte 20 % der Proteaseaktivität. Die Kurvenanstiege waren anders als bei Trypsin sehr unterschiedlich. Inhibitoren der Gruppe C (nur gezeigt für GST-1423.C) hemmten die Papainaktivität nicht.

Eine Inhibierung von Subtilisin konnte nur in geringem Maße (18 %) durch GST-P1H5.B erzielt werden (*Abb. 3.23*), alle anderen Fusionsproteine (nur gezeigt für GST-P1E9.A) hatten keinen Einfluss auf die Proteaseaktivität.

GST-P1E9.A inhibierte Aspergillopepsin I zu 95 % (*Abb. 3.24*). Alle anderen Fusionsproteine hemmten die Proteaseaktivität nicht. Pepsin A wurde von keinem der Fusionsproteine inhibiert.

In *Tabelle 3.4* wurde die Inhibierung der Proteasen Trypsin, α -Chymotrypsin, Papain und Subtilisin durch GST-Fusionsproteine bei molaren Verhältnissen von Inhibitor-Fusionsprotein zu Protease von 1 : 2 und 2,5 : 1 berechnet. Ein Verhältnis von 1 : 2 lag bei einer Konzentration von 1 μg Fusionsprotein pro μg Protease, ein Verhältnis von 2,5 : 1 bei einer Konzentration von 5 μg Fusionsprotein pro μg Protease vor. Die in der Tabelle dargestellten Ergebnisse zeigen vergleichend die bereits für die einzelnen Proteasen genannten Messwerte.

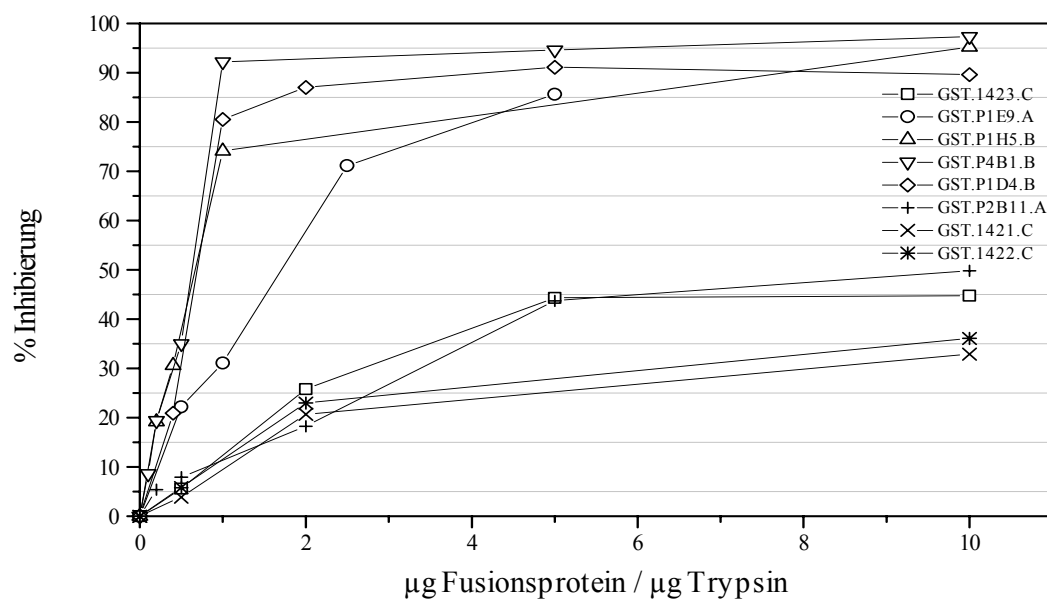


Abb. 3.20: Inhibition von Trypsin durch GST-Fusionsproteine.

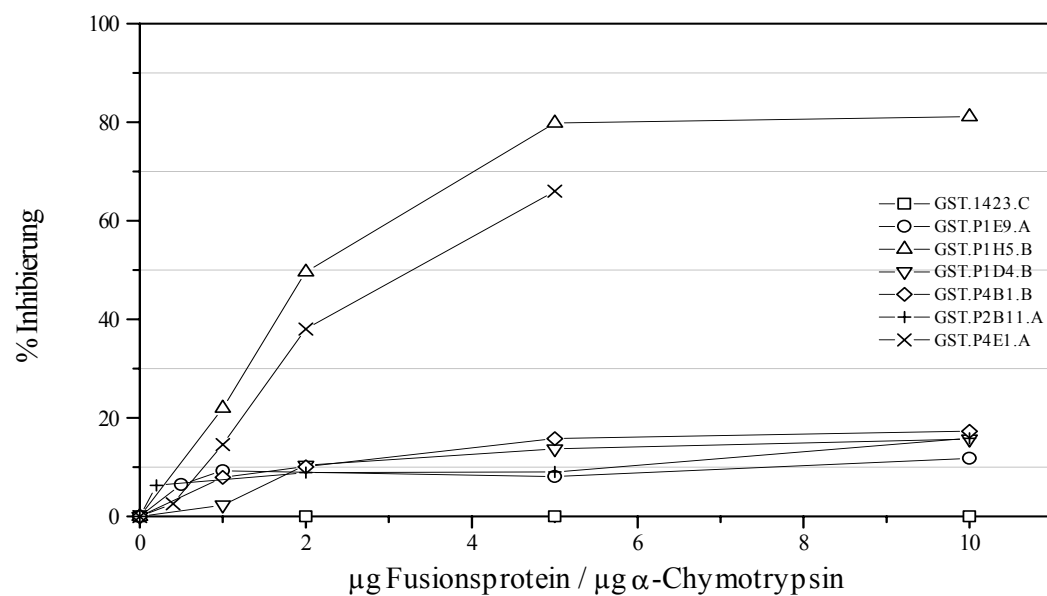


Abb. 3.21: Inhibition von α-Chymotrypsin durch GST-Fusionsproteine.

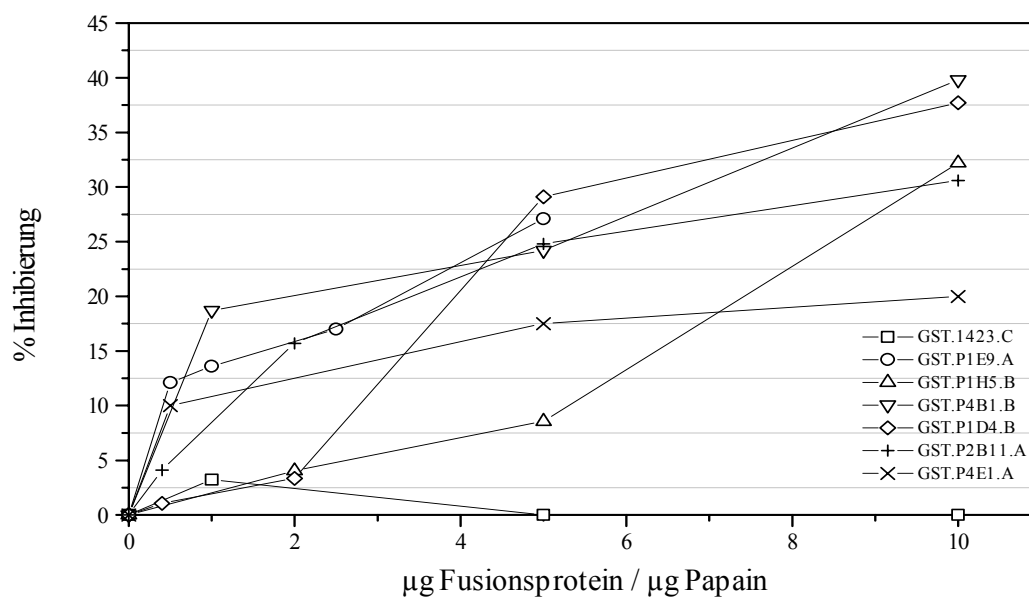


Abb. 3.22: Inhibition von Papain durch GST-Fusionsproteine.

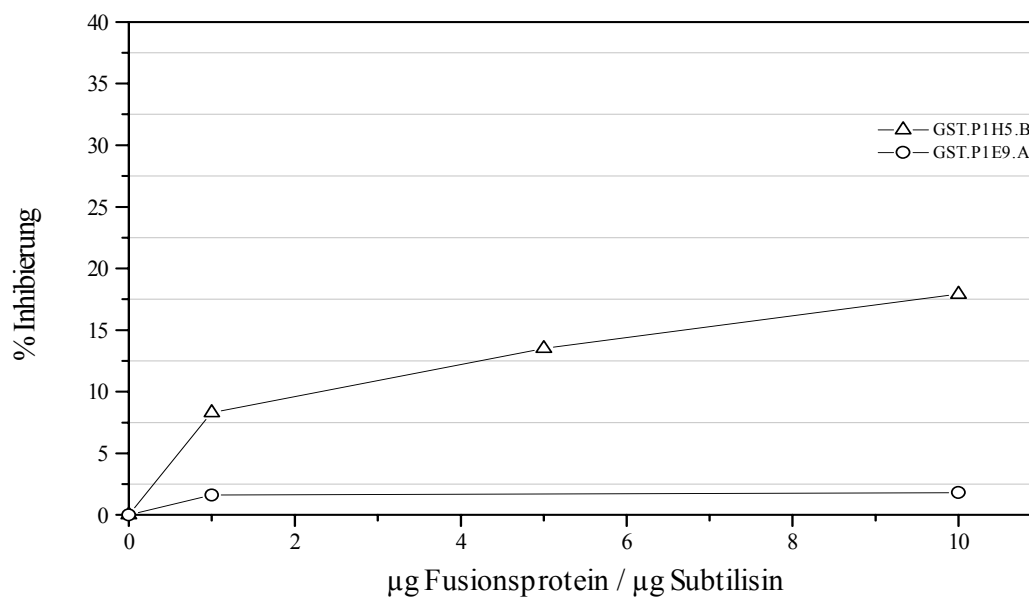


Abb. 3.23: Inhibition von Subtilisin durch GST-Fusionsproteine.

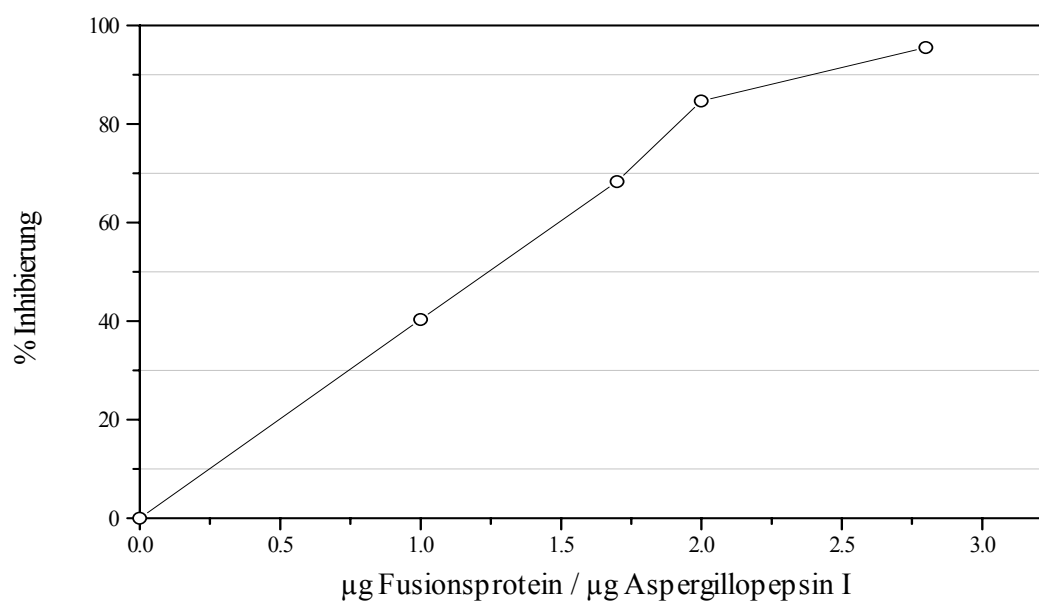


Abb. 3.24: Inhibierung von Aspergillopepsin I durch das Fusionsprotein GST-P1E9.A.

Tab. 3.4: Inhibierung verschiedener Proteasen durch Fusionsproteine bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen (Inhibitor : Protease).

Protease		Trypsin		α -Chymotrypsin		Papain		Subtilisin	
Inhibitor : Protease		1 : 1	2,5 : 1	1 : 1	2,5 : 1	1 : 1	2,5 : 1	1 : 1	2,5 : 1
Fusionsproteine	GST-P1E9.A	55	85	10	10	15	25	0	0
	GST-P2B11.A	20	45	10	10	15	25	0	0
	GST-P4E1.A	75	80	40	65	10	20	0	0
	GST-P1D4.B	85	90	10	15	0	30	0	0
	GST-P1H5.B	75	80	50	80	0	10	10	15
	GST-P4B1.B	95	95	10	10	20	25	0	0
	GST-1421.C	20	25	0	0	0	0	0	0
	GST-1422.C	20	25	0	0	0	0	0	0
	GST-1423.C	25	45	10	10	0	0	0	0
Inhibierung [%]									

3.3.3 Vergleich von GST-P1H5.B und P1H5.B

Um einen möglichen Effekt des GST-Tags auf die Inhibitoraktivität zu testen, wurde das GST-Tag des Fusionsproteins GST-P1H5.B mithilfe von Enterokinase abgespalten (2.2.20). Das resultierende Spaltprodukt P1H5.B wurde auf Inhibierung verschiedener Proteasen in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht und mit dem Fusionsprotein verglichen (Abb. 3.25). Die Inhibierung von Trypsin durch GST-P1H5.B betrug bei einer Konzentration von 0,4 μg Protein pro μg Protease 61 % der Inhibierung durch P1H5.B, bei der höheren Proteinkonzentration 85 %. Bei der Inhibierung von α -Chymotrypsin ergab sich bei der niedrigen Inhibitorkonzentration für das Fusionsprotein ein Wert, der 83 % des P1H5.B-Proteins betrug, bei der höheren Konzentration 76%. Die höchsten Differenzen zwischen der Inhibierung durch Fusionsprotein und der durch P1H5.B traten bei der Messung der Papaininhibierung auf. Die Inhibierung durch das Fusionsprotein betrug hier bei der niedrigen Konzentration 12 % der Hemmung durch P1H5.B, bei der Konzentration von 2 μg Protein pro μg Papain stieg dieser Wert auf 19%.

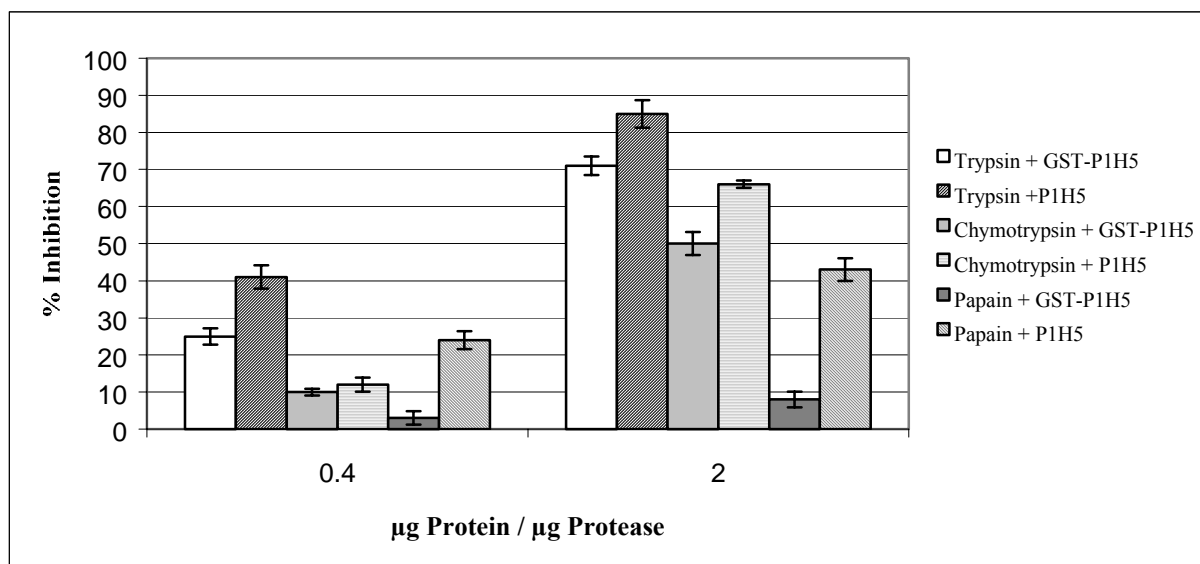


Abb. 3.25: Inhibierung von Proteasen durch das Fusionsprotein GST-P1H5.B und sein Enterokinase-Spaltprodukt im Vergleich. Fehlerindikatoren geben Standardabweichungen an.

3.3.4 Bestimmung einer Inhibitorkonstante

Die Inhibitor-Sättigungskurven (Abb. 3.20 – 3.24) zeigten für verschiedene Inhibitor-Fusionsproteine einen unterschiedlich steilen Verlauf. Die Sättigung des Enzyms mit dem Inhibitor wurde bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen erreicht. In einigen Fällen wurde das Enzym auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen nie vollständig gehemmt. Um die unterschiedlich hohe Affinität graphisch darzustellen, wurden die Sättigungskurven durch reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk linearisiert (Abb. 3.26). Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse gab den Wert " $1/-K_M$ " an. Die Bestimmung erfolgte analog zur Berechnung der Michaelis-Menten Konstante, der hier bestimmte " K_M "-Wert ist jedoch nicht mit dieser identisch, sondern stellt eine eigene "Inhibitorkonstante" dar. In dem vorliegenden System wurden Substrat- und Enzymkonzentration konstant gehalten und die Inhibitorkonzentration variiert.

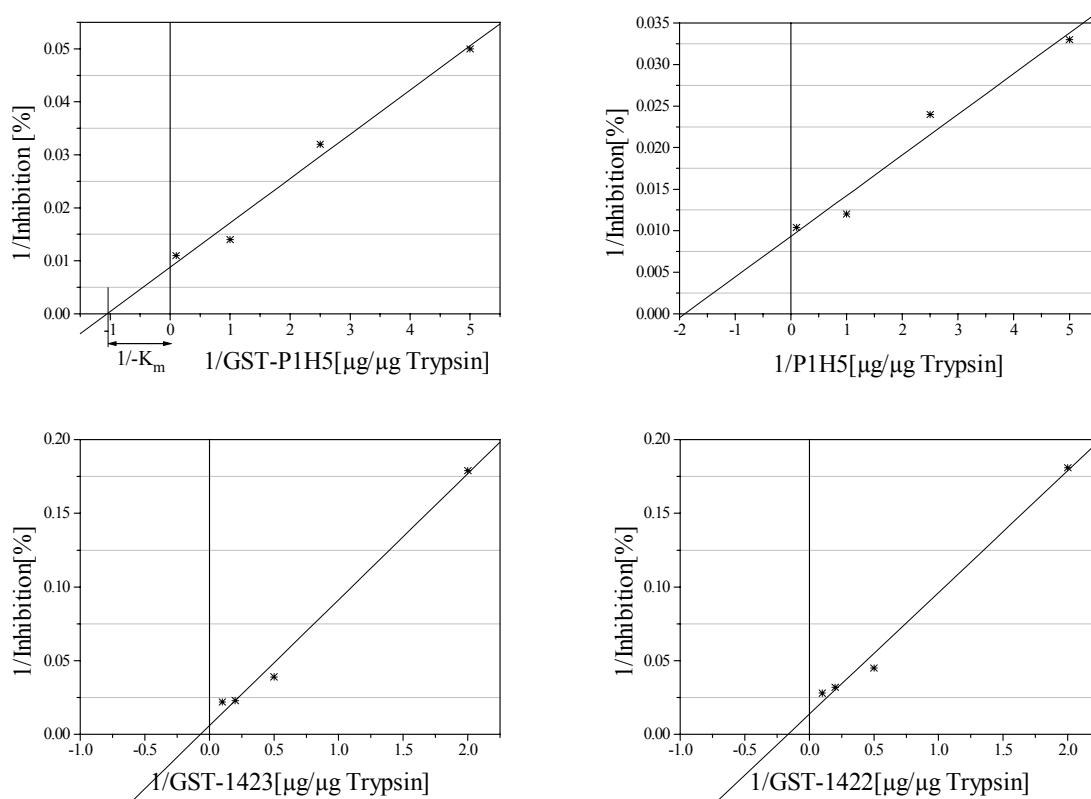


Abb. 3.26: Reziproke Darstellung von Inhibierungsrate und Inhibitorkonzentration nach Lineweaver-Burk. Trypsininhibition durch GST-P1H5.B, P1H5.B, GST-1423.C, GST-1421.C. Der Schnittpunkt von Regressionsgerade und Abszisse gibt " $1/-K_M$ " an.

Abbildung 3.26 zeigt den Vergleich der Inhibierung von Trypsin durch verschiedene Inhibitoren. Für das Fusionsprotein GST-P1H5.B ergab sich eine Konstante von 0,9, für das Enterokinase-Spaltprodukt lag der Wert bei 0,5. Das Protein GST-1423.C, das Trypsin zu höchstens 40 % inhibierte, hatte eine Konstante von 10, für GST-1422.C betrug der Wert 5,5.

3.3.5 Inhibierung des Wachstums mikrobieller Pilze durch Proteaseinhibitor-Fusionsproteine

Versuche zur Inhibierung des Mycelwachstums mikrobieller Pilze wurden mit den Fusionsproteinen GST-P1H5.B, GST-P1E9.A, GST-P2B11.A und GST-1423.C in Mikrotiterplatten durchgeführt (2.2.25.2). Sporenlösungen von *Fusarium moniliforme*, *Fusarium culmorum*, *Neurospora crassa* und *Fusarium naganai* wurden in ½ PDB-Medium mit verschiedenen Verdünnungen der Fusionsproteinlösungen bei 25°C unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Die verwendeten Proteinlösungen wurden zuvor 16 h gegen H₂O dialysiert um einen Einfluss von Salzen auf das Pilzwachstum auszuschließen. Kontrollansätze wurden mit H₂O anstelle von Proteinlösung befüllt. Die Mikrotiterplatten wurden alle 12 h auf Pilzwachstum kontrolliert. Bei *F. moniliforme* und *F. naganai* wurde nach 48 h, bei den übrigen Pilzen nach 72 h das Mycel mithilfe eines Mikroskopes fotografiert. Mittels eines Computerprogrammes wurde eine Größenbestimmung der Mycelfläche in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorgenommen. Je nach Stärke des Wachstums wurden fünf Stufen unterschieden (▽▽, ▽, □, ▲, ▲▲, Tab. 3.5), von keinem oder sehr geringem Wachstum bis zu starkem Wachstum, welches den Kontrollen glich.



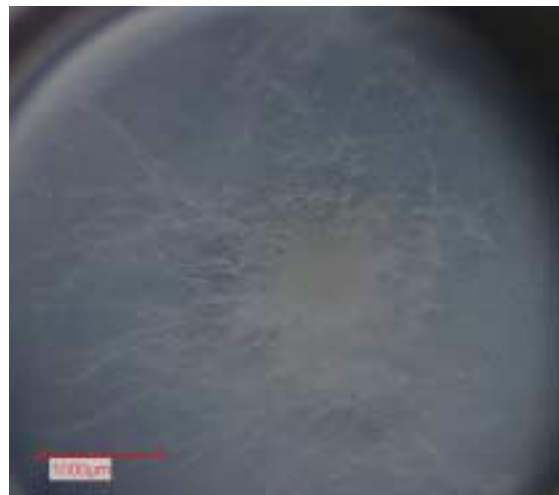
a, 0,3 µg/µL



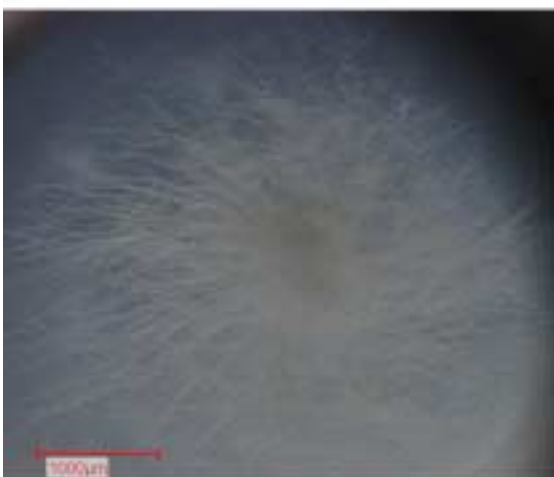
b, 0,15 µg/µL



c, 0,075 µg/µL



d, 0,019 µg/µL



e, 0,005 µg/µL

Abb. 3.26: Inhibierung von *F. moniliforme* durch GST-P2B11.A, Abstufungen des Mycelwachstums: a = ▽▽, b = ▽, c = □, d = ▲, e = ▲▲ (siehe auch *Tab. 3.5*), Konzentrationsangaben für Fusionsprotein GST-P2B11.A. Vergrößerung 16x.

Tab. 3.5: Inhibierung von *F. moniliforme* in Mikrotiterplatten. Mycelwachstum in fünf Stufen von sehr schwach bis stark ($\nabla\nabla$, ∇ , \square , \blacktriangle , $\blacktriangle\blacktriangle$), je zwei Experimente (Spalten) je Fusionsprotein. Kontrollen mit H_2O und GST-Tag.

Kontrollen (H ₂ O)		Proteinlösungen								Protein/[μg/μL]	Kontrollen (GST-Tag)		
		GST-P1H5.B		GST-P2B11.A		GST-P4E1.A		GST-1423.C			GST		[μg/μL]
▲▲	▲▲	▽	▽▽	▽▽	▽▽	□	□	□	□	0,3	▲▲	▲	0,15
▲	▲▲	▽	▽	▽	▽	□	□	▲	□	0,15	▲	▲▲	0,075
▲▲	▲	□	▽	□	□	□	▲	▲	▲	0,075	▲	▲	0,038
▲▲	▲▲	□	□	□	□	▲	▲	▲▲	▲	0,038	▲▲	▲	0,019
▲▲	▲▲	□	□	□	▲	▲▲	▲▲	▲	▲▲	0,019	▲▲	▲	0,010
▲▲	▲▲	▲	▲	▲	▲	▲▲	▲	▲▲	▲▲	0,010	▲	▲▲	0,005
▲	▲▲	▲▲	▲	▲▲	▲▲	▲	▲▲	▲▲	▲▲	0,005	▲	▲	0,003

Tabelle 3.5 zeigt die Inhibierung von *F. moniliforme* durch verschiedene Inhibitorfusionsproteine der drei Inhibitorgruppen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proteine bei vergleichbaren Konzentrationen das Wachstum von *F. moniliforme* unterschiedlich stark hemmen. Am meisten inhibieren dabei die Proteine GST-P1H5.B und GST-P2B11.A das Mycelwachstum, bis zu Proteinkonzentrationen von 0,15 oder 0,075 $\mu g/\mu L$ ist hier nur ein sehr geringes oder gar kein Wachstum festzustellen. Einen deutlich geringeren Effekt auf das Mycelwachstum zeigte GST-P4E1.A, den geringsten GST-1423.C. Hier war auch bei einer Konzentration von 0,3 $\mu g/\mu L$ nur eine "mittlere" Inhibierung des Pilzwachstums festzustellen. Den Abstufungen der Mycelgröße wurden in Abb. 3.26 Beispiele zugeordnet. In Abb. 3.26a sind nur vereinzelte Hyphen zu erkennen. Bei abnehmender Proteinkonzentration (b, c, d) sind dagegen deutlich mehr sowie längere Pilzhyphen festzustellen. Abb. 3.26e zeigt eine fast vollständig mit Mycel bewachsene Vertiefung. Die mit H_2O befüllten Kontrollansätze waren durchweg stark bis sehr stark bewachsen. Weitere Kontrollen wurden mit GST-Tag durchgeführt. Da es einen Anteil von 56 % am theoretischen Molekulargewicht des Fusionsproteins hat, wurde nur die halbe Proteinkonzentration eingesetzt. Auch diese Kontrollen zeigten keine Reduzierung des Mycelwachstums.

Versuche zur Inhibierung des Wachstums von *F. naganai*, *F. culmorum* und *N. crassa* zeigten keine hemmenden Effekte der vier Fusionsproteine auf diese Arten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen. Auch Versuche zur Inhibierung von *P. infestans*, die wie in 2.2.25.1

beschrieben auf festen PDA-Medien durchgeführt wurden, zeigten keine hemmende Wirkung der Fusionsproteine auf diesen Pilz.

3.3.6 Expression der Inhibitorklone *1421* und *1422* in transgenen Kartoffelpflanzen

Kartoffelpflanzen, die mit den "Kandidaten" für das Invertase-Inhibitorgen *1421* und *1422* transformiert und aus Kalli regeneriert worden waren (2.2.23.1), wurden im Gewächshaus kultiviert. Aus jungen Blättern von 280 verschiedenen Linien wurde DNA extrahiert (2.2.23.2) und mit für das Expressionskonstrukt spezifischen PCR-Reaktionen auf Vollständigkeit des Konstruktes überprüft (2.2.4). 200 Linien (60 %, Abb. 3.28) wiesen ein vollständiges Konstrukt auf. Von Inhibitorgen *1421* (*1422*) hatten 41 (45) Pflanzen den Konstrukttyp "volle Länge" (s. Abb. 2.1), 19 (43) "ohne Signalpeptid" und 11 (41) das Antisense-Konstrukt. Die Knollen dieser Linien wurden geerntet und zusammen mit nicht transgenen Knollen der Sorte "Désirée" drei Monate lang bei 4°C gelagert. In Knollen mit nicht inhibierter Invertase wurde ein Anstieg des Gehaltes an reduzierenden Zuckern erwartet. Die Knollen von transgenen Pflanzen, welche ein Expressionskonstrukt aus dem kälteinduzierbaren *ci2IA* Promoter sowie einer Variante des Inhibitorgens trugen, wurden auf eine Reduzierung dieser Akkumulation von reduzierenden Zuckern untersucht. Dazu wurden aus den bei 4°C gelagerten Knollen Zuckerauszüge hergestellt (2.2.24.1) und die Gehalte an D-Glucose und D-Fructose bestimmt (2.2.24.2).

Der Gehalt an reduzierenden Zuckern in den Zuckerauszügen der transgenen Kartoffelknollen wurde in Abb. 3.27 dargestellt. Die meisten transgenen Linien enthielten weniger reduzierende Zucker als die nicht-transgenen Désirée-Knollen (Abb. 3.27, *rot*). Dies war für Linien mit allen Konstrukttypen gleichermaßen festzustellen. Bei keiner der Varianten unterschied sich der Mittelwert signifikant vom Mittelwert aller Linien (7,6 µg/µL reduzierende Zucker). Die Knollen einiger Linien enthielten sehr geringe Mengen an reduzierenden Zuckern, die vier niedrigsten wurden in Abb. 3.27 grün dargestellt. Die Zuckerextrakte von Linie 2-8/2 (Abb. 3.27, 17) enthielten 0,73 µg/µL reduzierende Zucker, die von Linie 5-21/1 1,04 µg/µL, was 5,0 % und 6,6 % des Wertes der Standardsorte entsprach.

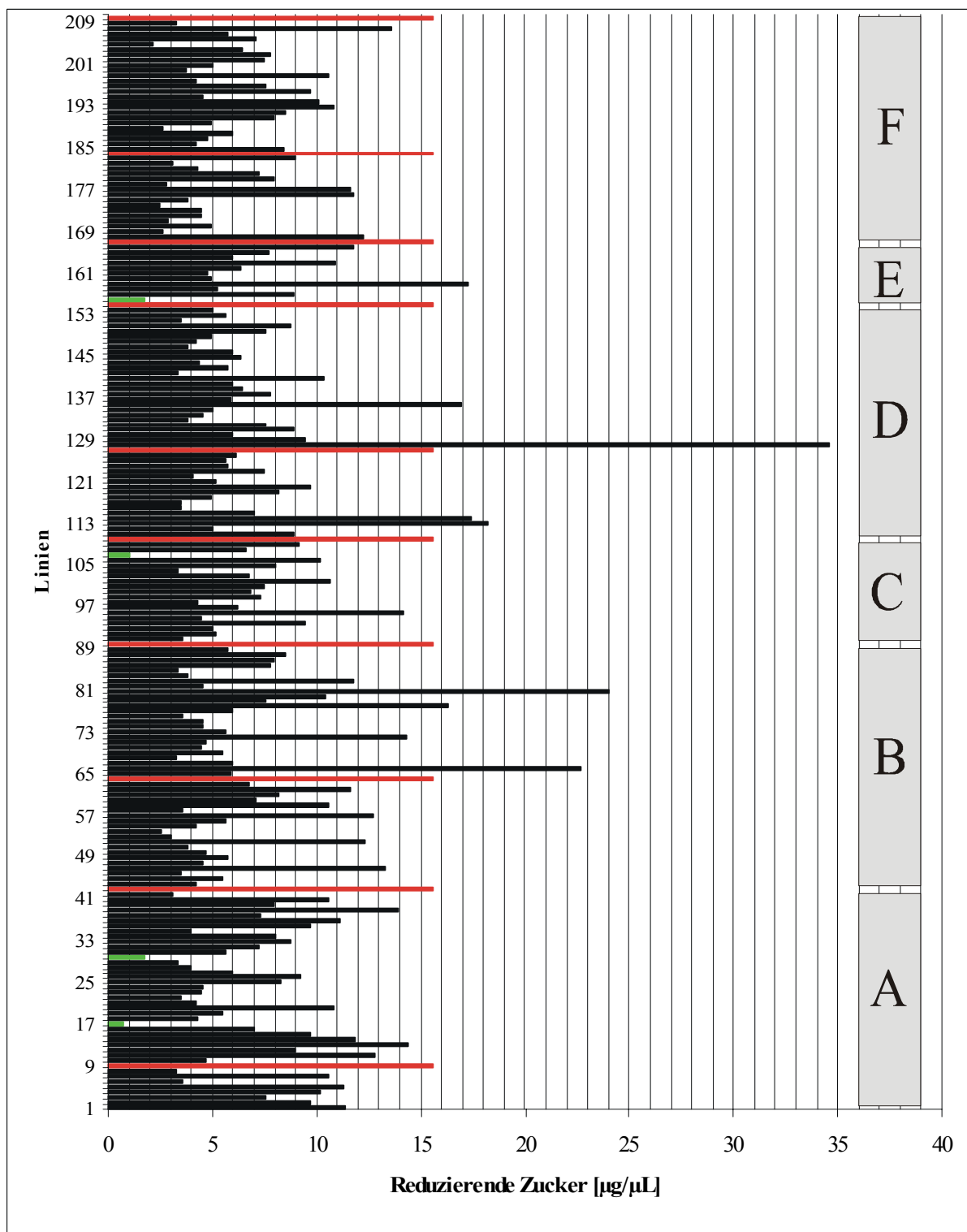


Abb. 3.27: Zuckergehalte der transgenen Kartoffelknollen nach Kaltlagerung. Rot: Désirée (Standard), grün: niedrigste Messwerte, A / B: 1421 / 1422 volle Länge, C / D: 1421 / 1422 ohne Signalpeptid, E / F: 1421 / 1422 Antisense, N = 210.

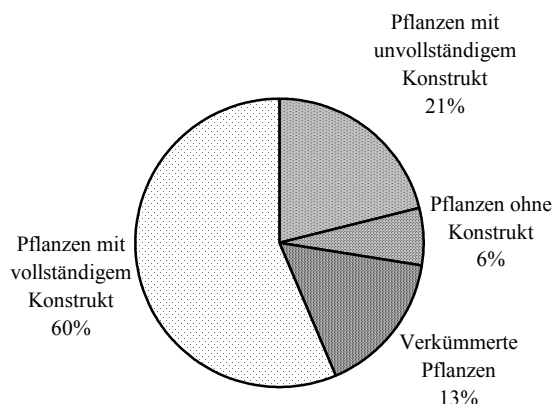


Abb. 3.28: Untersuchung der transgenen Pflanzen auf Vollständigkeit des Expressionskonstruktes mithilfe von PCR-Reaktionen. Gesamtzahl verschiedener Linien: 280.

In weiteren Versuchsschritten sollten die Linien mit signifikant niedrigem Zuckergehalt erneut im Gewächshaus kultiviert und die Messung der Zuckerkonzentration nach Lagerung bei 4°C wiederholt werden. Desweiteren war eine genetische Charakterisierung einiger Linien mit sehr niedrigem Zuckergehalt vorgesehen. Aufgrund einer PSTV-Infektion wurden jedoch keine weiteren Versuche mit den Linien vorgenommen.

3.4 Immunodetektion der Inhibitor-Fusionsproteine mit polyklonalen Antiseren

Mittels einer Western-Blot Analyse sollte festgestellt werden, ob eines der in *S. pombe* exprimierten GST-Fusionsproteine GST-1421.C oder GST-1422.C durch ein Antiserum gegen den nativen Invertase-Inhibitor bevorzugt detektiert wurde. Desweiteren wurden Proteine der verschiedenen Inhibitorgruppen A, B und C unter diesem Aspekt verglichen. In einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennte Fraktionen der Fusionsproteine wurden dazu mit verschiedenen polyklonalen Antiseren detektiert. Zunächst wurden die Fusionsproteine GST-1421.C, GST-1422.C, GST-P1H5.B sowie eine Invertase-Inhibitor Aufreinigung von Dr. H. Glaczinski mit einem Antiserum gegen diese Inhibitor Aufreinigung (Nr. 384) detektiert (Abb. 3.29). Die Invertase-Inhibitor Fraktion zeigte zwei schwache Banden bei 20 – 24 kD sowie

zwei weitere bei 33 und 48 kD. GST-1421.C und GST-1422.C zeigten sehr intensive Banden , am stärksten bei 33 kD und 48 kD. Bei GST-P1H5.B wurden drei Banden detektiert, bei 25 kD, 33 kD und 48 kD. Zwar wurden die "Invertase-Inhibitor" Fusionsproteine bei gleicher aufgetrennter Proteinmenge stärker detektiert als GST-P1H5.B, das Antiserum reagierte jedoch nicht *spezifisch* mit Fusionsproteinen der Gruppe C.

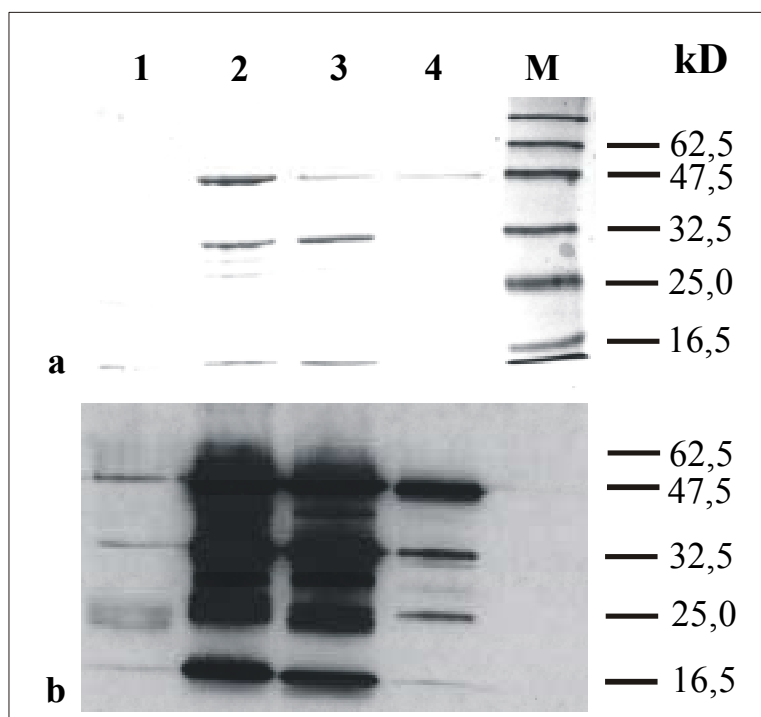


Abb. 3.29: SDS-PAGE (a) und Western-Blot Analyse mit Antiserum 384 gegen Invertase-Inhibitor Aufreinigung (b). 1 = Invertase-Inhibitor Präparation, 2 = 1421.C-GST, 3 = 1422.C-GST, 4 = P1H5.B-GST.

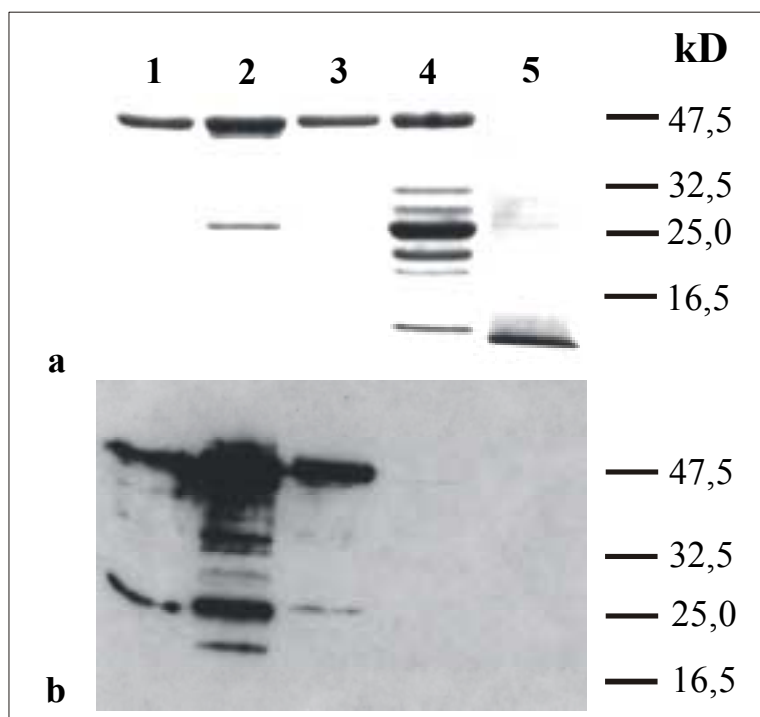


Abb. 3.30: SDS-PAGE (a) und Western-Blot Analyse mit Antiserum 377 gegen 16 kD-Bande aus einer Kunitz-Typ Inhibitor Aufreinigung (b). 1 = GST-P1E9.A, 2 = GST-P1H5.B, 3 = GST-P4E1.A, 4 = GST-1421.C, 5 = *S. pombe* nicht induziert, Gesamtprotein

Weiterhin wurden Fusionsproteine der verschiedenen Gruppen mit einem polyklonalen Antiserum gegen eine 16 kD-Bande einer Aufreinigung eines Kunitz-Typ Inhibitors der Gruppe B detektiert (Abb. 3.30). Bei GST-P1E9.A, GST-P1H5.B und GST-P4E1.A waren je zwei intensive Banden bei 25 kD und 48 kD sowie bei GST-P1H5.B mehrere schwächere Banden zu erkennen. GST-1421.C wurde nicht detektiert, ebenso eine Fraktion von Gesamtprotein aus *S. pombe*. Ein weiteres polyklonales Antiserum gegen eine Fraktion mit 22 – 24 kD großen Banden des Kunitz-Typ Inhibitors zeigte keine Spezifität für eine der Inhibitorgruppen.

3.5 Organisation der Inhibitorgene im Kartoffelgenom

3.5.1 Screening einer BAC-Bibliothek mit Inhibitor DNA-Sonden

Der Vergleich der Kunitz-Typ Inhibitorsequenzen aus der EST-Bibliothek (3.1.1) hatte gezeigt, dass die Inhibitoren sich in drei Gruppen mit zahlreichen Vertretern gliederten. Aus der Gruppe A wurden 11, aus Gruppe B 28 und aus Gruppe C 18 unterschiedliche Klone gefunden. Es sollten nun Versuche durchgeführt werden, die über die Organisation der Inhibitorgene im

Kartoffelgenom Auskunft gaben. Es sollten Aussagen darüber gemacht werden, wieviele verschiedene Gene es mindestens gibt, ob es sich um Allele oder unerschiedliche Gene handelt, und ob es Regionen gibt, in denen verschiedene Inhibitorgene beieinanderliegen. Dazu wurde eine BAC-Bibliothek (Lion Bioscience AG, Heidelberg) des Kartoffelgenoms mit 101376 Klonen nach BAC-Klonen durchsucht, welche Kopien der Inhibitorgene enthielten. Dazu wurden "High Density Filter" mit DNA der BAC-Klone angefertigt, welche mit gruppenspezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert wurden (2.2.10). Für die Synthese der DNA-Sonden mithilfe von PCR-Reaktionen wurden für die Gruppe A die Primer 23 und 27, für Gruppe B 28 und 32 sowie für Gruppe C 33 und 35 verwendet (2.2.4, *Tab. 2.1*). Für A wurde die Sequenz von Klon P1E9.A, für B von Klon P4B1.B und für C von Klon 1421.C amplifiziert. Mit der Sonde P1E9.A wurden sechs BAC-Klone detektiert, mit der Sonde P4B1.B sieben, von denen fünf mit Gruppe A übereinstimmten (*Tab. 3.6*). Die Sonde 1421.C detektierte 16 BAC-Klone.

Tab. 3.6: BAC-Klone, die mit DNA-Sonden für die Inhibitorgruppen auf den High-Density-Filtern detektiert wurden.

Gruppe	DNA-Sonde	Detektierte BAC-Klone
A	P1E9	BA-23H7, 60A13, 66C3, 99F2, 223L20, 251C18
B	P4B1	BA-23H7, 60A13, 66C3, 174C14, 184P10, 223L20, 251C18
C	1421	BA-47O2, 86G19, 120B23, 120P19, 129P18, 144M23, 146D7, 185H21, 188P10, 200M6, 198O12, 209N8, 222I16, 248A17, 249P20, 259D20

3.5.2 Analyse von mit *Hind*III und *Taq*I verdauter DNA

Um eine Abschätzung der Kopienzahl der Inhibitorgene im Kartoffelgenom vorzunehmen, wurde DNA der in *Tabelle 3.6* aufgeführten BAC-Klone, die mit DNA-Sonden für Gruppe A / B und C detektiert wurden, mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Taq*I verdaut. Die meisten der aus der EST-Bibliothek stammenden Inhibitor-Klone wiesen keine internen Schnittstellen für *Hind*III auf.

100 ng mit *Hind*III verdaute BAC-DNA je Spur wurde auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und es wurde eine Southern-Blot Analyse durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit DNA-Sonden für *PIE9* sowie *1421*. In Gruppe C konnten sechs verschiedene Fragmente detektiert werden (Abb. 3.31). Eine Bande von 0,5 kb (BA146D7, BA185H21), von 2,0 kb (BA120B23, BA144M23, BA259D20, schwächer bei BA248A17), 3,5 kb (BA86G19, BA129P18), 5,5 kb (BA200M6, BA222I16), 6,0 kb (BA249P20) und von 7,5 kb (BA259D20). In Gruppe A wurden ebenfalls sechs verschiedene Banden detektiert: ein Fragment von 3,1 kb (BA241C18), von 5,0 kb (BA66C3, BA223L20), 8,0 kb (BA23H7), 9,0 kb (BA251C18), 10,0 kb (BA66C3, schwächer in BA60A13 und BA99F2) sowie von 11,0 kb (BA223L20). In Gruppe C zeigte nur BA259D20 zwei Fragmente, in Gruppe A die BACs BA66C3, BA223L20 und BA251C18.

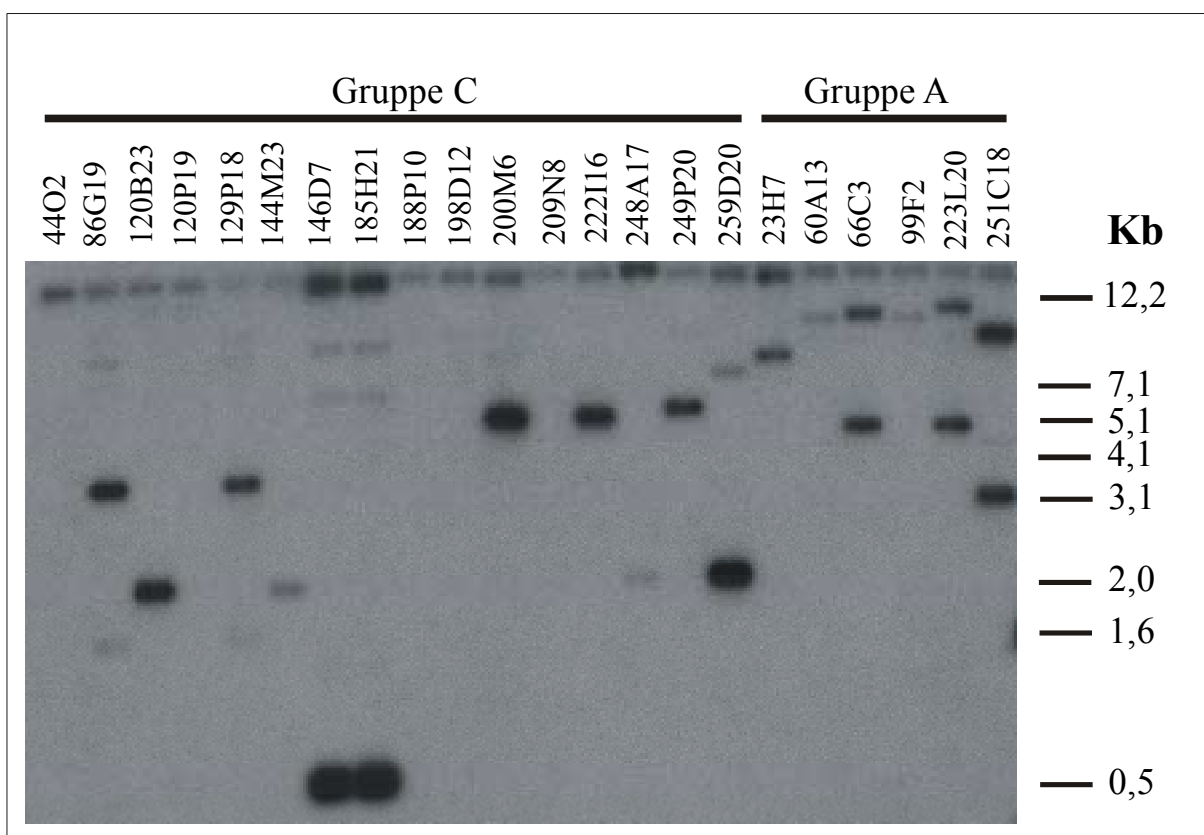


Abb. 3.31 (vorherige Seite): Southern Blot der mit *Hind*III verdauten BAC-Klone (BAC-Bibliothek BA), hybridisiert mit radioaktiv markierten DNA-Sonden 1421 (Gruppe C) und *PIE9* (Gruppe A).

100 ng mit *TaqI* verdaute BAC-DNA je Spur wurde auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (2.2.11.1). Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten DNA-Sonden für 1421. *Tabelle 3.7* zeigt die detektierten Fragmente für sieben verschiedene BAC-Klone. Die BAC-Klone, welche in der Southern-Blot Analyse nur eine detektierte Bande zeigten, wiesen hier mehrere Banden auf.

Insgesamt konnten 17 verschiedene Fragmenttypen detektiert werden. Die zur Hybridisierung verwendete Sonde 1421 hatte eine Länge von 600 bp und entsprach der für das Inhibitorprotein ohne Signalpeptid kodierenden Sequenz. In diesem Sequenzbereich wiesen die Provita-Klone der Gruppe C (*Tab. 3.7*) höchstens eine *TaqI*-Schnittstelle auf. Die analysierten BAC-Klone, bei denen in der Southern-Blot Analyse nur ein Fragment detektiert werden konnte, enthielten also mehrere Kopien von Inhibitorgenen der Gruppe C.

Tab. 3.7: Mit DNA-Sonde 1421 detektierte Fragmente bei mit *TaqI* verdauter BAC-DNA, aufgetrennt auf Polyacrylamidgel. + / - = vorhanden / nicht vorhanden, ? = schwaches Signal.

Fragment	bp	BAC-Klone						
		BA86G19	BA120B23	BA146D7	BA200M6	BA222I16	BA249P20	BA259D20
a	260	-	-	-	-	-	-	+
b	270	-	+	-	+	+	+	-
c	340	-	-	-	+	+	-	+
d	345	-	+	-	-	-	-	-
e	350	+	-	-	-	-	+	-
f	560	-	-	-	-	-	-	+
g	590	-	-	-	+	+	+	-
h	600	-	-	-	-	-	-	+
i	615	-	+	-	+	+	+	-
k	840	-	+	+	-	-	-	-
l	860	-	+	-	+	+	?	-
m	890	-	-	-	-	-	-	+
n	1150	-	+	-	+	+	-	-
o	1200	-	-	-	+	+	-	-
p	1350	-	-	-	-	+	-	+
q	900	-	+	+	-	-	-	-
r	1700	+	-	-	-	+	-	-

3.5.3 Vergleich der 3'-nichttranslatierten DNA-Sequenzen der Inhibitorklone

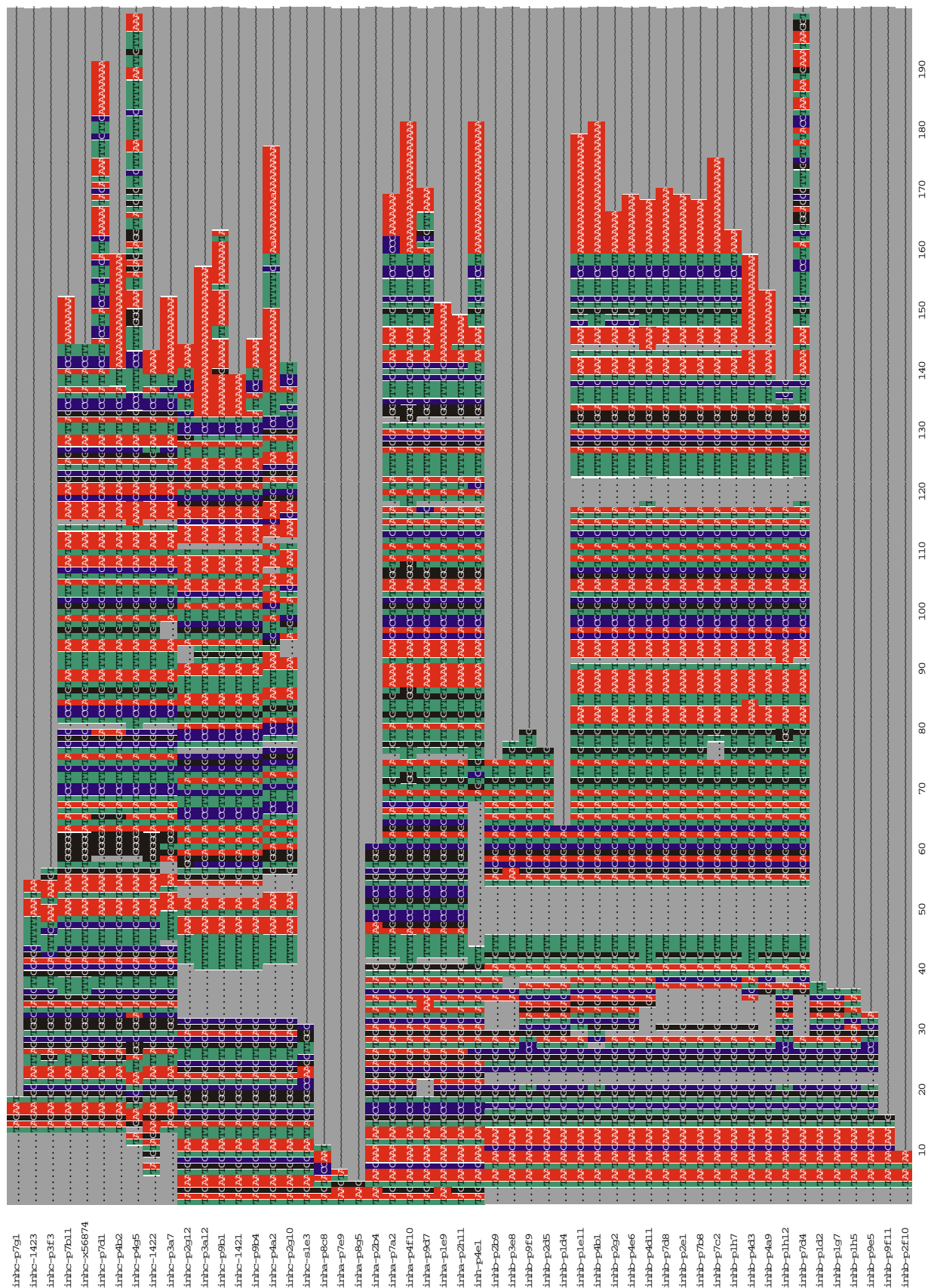
Die 3'-nichttranslatierten DNA-Sequenzen eines Teils der aus der EST-Bibliothek stammenden Inhibitorsequenzen wurden mithilfe des Computerprogrammes PILEUP verglichen (*Abb. 3.32*). Die Gruppen A, B und C wiesen hierbei wieder deutliche Unterschiede auf. Innerhalb der Gruppen konnten nur bei C zwei stark unterschiedliche Varianten festgestellt werden, eine umfasste die ersten zehn Klone in *Abb. 3.32*, die zweite alle übrigen Klone von Gruppe C. Ein Teil der Klone in *Abb. 3.32* ist nicht im Vergleich der Aminosäuresequenzen (*Abb. 3.2, 3.3, 3.4*) aufgeführt. Es wurden stattdessen identische Klone verwendet (*Tab. 3.1*, bei denen die Sequenzierung des 3'-nichttranslatierten Bereichs besser funktioniert hat).

Tabelle 3.8 zeigt alle 13 verschiedenen Varianten der Provita Inhibitorklone der Gruppe C (insgesamt 18 verschiedene Klone, 13 von Provita und 5 von Saturna). Die Distanzen zwischen den Klonen wurden als Substitutionen je 100 Aminosäuren berechnet. Die Zahl der verschiedenen Kopien von Inhibitorgenen der Gruppe C konnte nach Abschätzungen basierend auf den Analysen der verdauten BAC-DNA, den aus der Distanzmatrix hervorgehenden Abständen sowie der DNA-Sequenzen der 3'-nichttranslatierten Bereiche (3.5.3) aufgrund der Tetraploidie der Ursprungspflanzen der Sequenzen auf mindestens vier festgelegt werden.

Tab. 3.8: Distanzmatrix der Provita Inhibitorklone der Gruppe C. Werte geben Substitutionen je 100 Aminosäurereste an.

	P3A7	P7D1	P7B11	P3B11	I421	P9B1	P9B4	I423	I422	P3C3	P3C4	P4G5	P7G8
P3A7	0	12,63	13,49	19,27	9,26	10,09	11,77	1,40	7,64	6,79	11,75	10,93	9,38
P7D1		0	4,65	7,92	10,86	11,51	12,06	10,39	10,23	11,01	12,63	12,54	15,28
P7B11			0	3,06	11,40	12,06	12,60	12,00	10,76	11,01	13,20	13,09	17,75
P3B11				0	15,80	15,89	17,17	15,18	14,39	11,01	14,64	16,43	15,26
I421					0	0,46	1,40	7,27	4,25	5,07	7,17	6,82	12,90
P9B1						0	1,88	7,81	4,79	5,07	7,71	7,34	12,90
P9B4							0	8,85	5,78	6,84	8,81	8,37	14,68
I423								0	6,76	6,24	9,36	9,42	5,63
I422									0	0,54	2,46	2,34	11,73
P3C3										0	0,54	2,74	6,24
P3C4											0	4,48	11,86
P4G5												0	14,16
P7G8													0

Abb 3.32 (folgende Seite): Vergleich der 3'-nichttranslatierten Bereiche einiger Inhibitorklone.
x56874 = Kunitz Typ Inhibitorklon aus *S. tuberosum* (Datenbank).



4. Diskussion

4.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Inhibitorgruppen

4.1.1 Charakterisierung von Kunitz Typ Inhibitorklonen aus *S. tuberosum*

Aus einer EST-Bibliothek mit 1596 Klonen wurden durch Vergleich mit in Datenbanken gespeicherten Sequenzen 78 Klone entnommen, welche zu Kunitz Typ Inhibitoren homolog waren. Zu diesen Sequenzen wurden drei früher isolierte Klone (1421, 1422, 1423) hinzugefügt. Durch Vergleich der aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen bot sich die Möglichkeit, aufgrund von Ähnlichkeiten eine Gruppen-einteilung vorzunehmen. Aus diesen Gruppen wurden dann in einem weiteren Schritt Vertreter ausgewählt, die in funktionellen Analysen auf biologische Aktivität geprüft wurden. Durch Vergleich mit beschriebenen, bereits charakterisierten Klonen (Tab. 3.1) konnten bereits einige Aussagen über biochemische Eigenschaften und Funktionalität gemacht werden.

Bei der Untersuchung der Inhibitorklone mithilfe des Computerprogramms PILEUP konnten drei Gruppen identifiziert werden, die bereits von Ishikawa *et al.* (1994) gefunden worden waren (Abb. 3.2, 3.3, 3.4). Ishikawa *et al.* (1994) isolierten Vertreter der Gruppen A und B und stellten innerhalb der Gruppe A Sequenzhomologien von 92 % bis 98 %, innerhalb der Gruppe B von 91 % bis 98 % und zwischen diesen Gruppen von 76 % bis 81 % fest. Sie verglichen die Gruppen A und B mit einem Klon der Gruppe C aus einer Datenbank und ermittelten Ähnlichkeiten von 52 % bis 53 %. In der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Werte bezüglich der Homologie gefunden mit Ausnahme des Vergleiches der Gruppen A und B mit der Gruppe C: hier wurden nur 40 % bis 46 % Ähnlichkeit (34 % – 38 % Identität) auf Proteinebene gefunden (3.1.2). Auch bei der Erstellung eines Phylogramms (Abb. 3.5) wurde diese Gruppeneinteilung wiedergefunden. Bootstrap-Werte von 94 % bis 96 % an den Verzweigungen zeigen, dass die Einteilung zuverlässig ist (> 50 % entspricht einem signifikanten Wert, Mukhopadhyay, 2000).

Die Inhibitoren der Gruppe A wurden durch Datenbankvergleiche als Inhibitoren von sauren Proteasen (Aspartat Proteasen) identifiziert. Ein Inhibitor dieses Typs, welcher in Pflanzen gefunden wurden, ist der Cathepsin D Inhibitor aus Kartoffeln (Mares *et al.*, 1990, Hannapel

1994, Strukelj *et al.*, 1990 und 1994). Inhibitoren der Gruppe B wurden als Kunitz Typ Proteaseinhibitoren bestimmt, welche dem Cathepsin D Inhibitor sehr ähnlich sind. Entsprechende Klone wurden auch von Strukelj *et al.* (1990) und Ishikawa *et al.* (1994) gefunden (Tab. 3.2). Inhibitorklone der Gruppe C wurden den Inhibitoren von Cystein Proteasen zugeordnet. Derartige Inhibitoren wurden von Yamagishi *et al.* (1991) und Gruden *et al.* (1997) beschrieben. Diese Gruppe umfasst auch Inhibitoren, welche Serin Proteasen hemmen.

Die Aminosäuresequenzen und teilweise auch die Aminosäurekomposition variieren bei Inhibitoren innerhalb der Gruppe C stärker als in den beiden anderen Gruppen. Für alle hier dargestellten Inhibitoren trifft die Beobachtung von Ryan (1981) zu, dass pflanzliche Proteaseinhibitoren einen geringen Gehalt an Methionin, Histidin und Tryptophan aufweisen, welche zum Teil ganz fehlen, während sie einen hohen Anteil an Asparaginsäure, Serin und Lysin haben. Im Gegensatz zu Ryan (1981) konnte jedoch kein besonders hoher Anteil an Glutaminsäure festgestellt werden.

Viele Proteine unterliegen einer post-translationalen Modifikation, wie beispielsweise der Abspaltung von N-terminalen Signalsequenzen, der Ausbildung von Disulfidbrücken oder der Glykosylierung. Typische Sequenzen, welche Oligosaccharide binden, sind die Aminosäurefolgen N-x-S/N-x-T (Stryer, 1990) sowie N-S-S (Ishikawa *et al.*, 1994). Letztere Aminosäurefolge ist bei einigen Inhibitoren der Gruppe A an Position 60 zu finden (Abb. 3.2), was auf ein möglicherweise glykosiliertes Translationsprodukt hinweist.

Durch biochemische Analysen wurden Aminosäurereste bestimmt, denen eine Funktion bei der Inhibierung von Proteasen zugeschrieben wird (Koide und Ikenaka, 1973, Suh *et al.*, 1991). Das aktive Zentrum für die Inhibierung von Trypsin besteht demnach aus dem Aminosäuremotiv P-V-R in Position 111 – 113 (Abb. 3.2, 3.3, 3.4). Als aktiver Aminosäurerest wird Arginin in Position 113 beschrieben. Dieses Motiv ist bei sämtlichen Inhibitoren der Gruppen A und B zu finden, bei Gruppe C sind lediglich Prolin und Valin vorhanden, der Argininrest wurde durch Methionin oder Valin sowie in einem Fall durch Lysin ersetzt. Der Methioninrest in Position 113 bei einigen Inhibitoren der Gruppe C gehört dabei zu den Aminosäureresten, welche als ein Unterscheidungsmerkmal der möglichen Invertase-Inhibitorklone von den übrigen Vertretern der Gruppe bestimmt wurden (3.1.5). Auf die möglichen Invertase-Inhibitorklone wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. Suh *et al.*

(1991) stellten bei biochemischen Analysen zudem fest, dass bei Trypsininhibitoren eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten in den Positionen 90 und 145 ausgebildet wird. Diese Cysteinreste sind von einigen hoch konservierten Aminosäureresten umgeben: Prolin-91, Valin-94, Lysin-143, Leucin-144 und Valin-146. Bei den Gruppen A und C sind beide Cysteinreste und alle benachbarten konservierten Aminosäurereste vorhanden, bei Gruppe B sind die Cysteinreste vorhanden, Prolin-91 wurde durch Alanin, Valin-94 teilweise durch Isoleucin und Leucin-144 bei einigen Vertretern durch Methionin ersetzt. Die Inhibitoren der Gruppen A und B besitzen also durchweg den für die Inhibierung von Trypsin notwendigen Argininrest. Die für diese Aktivität ebenfalls notwendige Bildung der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 90 und 145 kann bei einem Teil der Inhibitoren der Gruppe B jedoch möglicherweise nicht erfolgen. Inhibitoren der Gruppe C haben aufgrund des Vergleiches mit bekannten Sequenzmotiven keine oder eine nur geringe Trypsin inhibierende Aktivität. Suh *et al.* (1991) fanden bei biochemischen Analysen auch ein Sequenzmotiv, dem eine Funktion bei der Inhibierung von α -Chymotrypsin zugeschrieben wurde. Dieses Motiv mit der Konsensussequenz C-P-x-x-L-x-C ist bei Inhibitoren der Gruppe C in Position 201 – 207 vorhanden, wobei der Leucinrest von den Autoren als aktives Zentrum bestimmt wurde. Über Sequenzmotive, die eine Funktion bei der Inhibierung anderer Enzyme, z.B Amylasen, Invertasen oder anderer Proteasen haben, gibt es bislang nur sehr wenige biochemische Untersuchungen (Shewry, 1999), so dass von der Aminosäuresequenz her keine weiteren Aussagen über mögliche biologische Aktivitäten gemacht werden können.

4.1.2 Invertase-Inhibitorklone

Neben den bereits durch Dr. H. Glaczinski isolierten möglichen Invertase-Inhibitorklonen 1421 und 1422 (unveröffentlichte Daten) wurden in dieser Arbeit beim Vergleich der Inhibitorklone aus der EST-Bibliothek sechs weitere Kandidaten gefunden (Abb. 3.7). Sämtliche Vertreter sind aufgrund einer Homologie von mehr als 90 % der Gruppe der Cystein Proteaseinhibitoren zuzuordnen. Alle verfügen über die Merkmale, die zur Abgrenzung der möglichen Invertase-Inhibitoren von den übrigen Vertretern der Inhibitorfamilie herangezogen wurden. Dies sind vor allem einige Aminosäurepositionen, welche durch partielle N-terminale Sequenzierungen

von Spaltprodukten des aufgereinigten, nativen Invertase-Inhibitors bestimmt wurden (3.1.6). Ein weiteres Strukturmerkmal sind Disulfidbrücken, welche die Tertiärstruktur, also die native Faltung eines Proteins bestimmen. Der native Invertase-Inhibitor enthält mindestens eine Disulfidbrücke, was Pressey (1967) durch Inaktivierung des Inhibitors durch β -Mercaptoethanol zeigte. Die Aminosäuresequenzen aller acht Klone weisen mindestens zwei, in der Regel vier Cysteinreste auf, so dass bis zu sechs Möglichkeiten für die Ausbildung von Disulfidbrücken existieren.

Aminosäuremotive, an denen eine Glykosylierung erfolgen könnte, wurden in keiner der acht Sequenzen gefunden. Diese Beobachtung stimmt mit der von Pressey (1968) und Bracho und Whitaker (1990) überein, welche den von ihnen isolierten Invertase-Inhibitor als nicht glykosyliertes Protein charakterisierten.

Die 13 N-terminalen Aminosäuren L-V-L-P-E-V-Y-D-Q-D-G-N-P, welche von Dr. H. Glaczinski durch teilweise Sequenzierung der Aminosäuresequenz des aufgereinigten Invertase-Inhibitors bestimmt worden waren, sind bei allen Inhibitoren dieser Gruppe ohne Abweichung zu finden. Dieses Sequenzstück findet sich auch in zueinander sehr homologen Klonen aus Datenbanken (Stiekema *et al.*, 1988, Yamagishi *et al.*, 1991, Krizaj *et al.*, 1993) wieder. Alle acht Klone weisen Lysin an Position 98, Methionin in den Positionen 103 und 173, Tyrosin oder Asparaginsäure in Position 112 sowie Asparagin in Position 175 auf. Variationen in der Aminosäuresequenz sind in den Positionen 111 bis 113, 144, 189 sowie im C-terminalen Bereich ab Position 205 festzustellen. Dabei handelt es sich ausschließlich um nicht-konservative Substitutionen, welche den sauren oder basischen Charakter des Proteins beeinflussen. Auffällig ist hierbei, dass bei 1421.C, P9B1.C und P9B4.C die Substitutionen die Proteine eher "saurer" machen und bei den übrigen Vertretern eine "basische" Tendenz zeigen. Das Signalpeptid ist bei keinem der Inhibitoren vollständig, ein Vergleich mit dem Klon x56874 aus *S. tuberosum* (Abb. 3.6), dessen Signalpeptid mit dem der Klone 1421.C und 1422.C fast identisch ist, zeigt, dass lediglich Methionin und Lysin fehlen. Alle Inhibitoren zeigen ein sehr ähnliches, hydrophobes Signalpeptid, welches eine Lokalisierung in der Vakuole wahrscheinlich macht (Suh *et al.*, 1990). Alle Vertreter verfügen über eine kurze Sequenz innerhalb dieses Signals, die bei Cystein Proteaseinhibitoren gefunden wurde, welche in die Vakuole sekretiert werden. Die Konsensussequenz hierfür ist N-P-I-x-L-P-S (Ishikawa *et al.*, 1994, Nakamura und Matsuoka, 1993, Park *et al.*, 2000). Matsuoka *et al.* (1986, 1990)

zeigten für Sporamin A, ein Protein aus der Süßkartoffel, welches ebenfalls zur Kunitz Typ Inhibitorfamilie zählt und in der Vakuole lokalisiert ist, dass dieses kurze Peptid erst nach dem Transport in die Vakuole abgetrennt wird, so dass also insgesamt zwei Spaltungen des Proteins in der Zelle erfolgen. Die Konsensussequenz des Signalpeptids für einen Transport in die Vakuole bei der Süßkartoffel lautet N-P-I-x-L-P. Gruden *et al.* (1997) zeigten, dass Cystein Proteaseinhibitoren in Kartoffeln, welche dieses Signal besitzen, nach Behandlung der Pflanzen mit Jasmonsäure in der Vakuole akkumuliert wurden. Es ist daher möglich, dass diese Inhibitoren Teil eines Verteidigungsmechanismus der Kartoffelpflanze gegen Fraßinsekten und Pathogene sind. Die Funktion von Jasmonsäure bei der Signalübertragung nach einer Verletzung der Pflanze wurde von Farmer *et al.* (1992) demonstriert. Bei den Klonen 1421.C, P9B1.C und P9B4.C fällt das Fehlen von zwei Asparaginsäureresten im Signalpeptid auf. Davon ist die Konsensussequenz für eine Sekretion in die Vakuole zwar nicht betroffen, das kürzere Signal und der weniger saure Charakter könnten jedoch Einfluss auf den Transport des Proteins haben.

Für die isoelektrischen Punkte (*pI*) der Aminosäuresequenzen der Klone 1421.C und 1422.C wurden mithilfe eines Computerprogramms leicht alkalische Werte (*Tab. 3.2b*) bestimmt. Die *pI*-Werte für die übrigen Klone (hier nicht dargestellt) lagen in einem ähnlichen Bereich. Inhibitoren der Gruppe C, welche zu mindestens 85 % zu Cystein Proteaseinhibitoren homolog sind (*Tab. 3.2a*), könnten daher durchaus Invertase-Inhibitoren sein. Die proteolytische Reaktion von Cystein Proteasen, beispielsweise von Papain, sowie die Hemmung dieser Proteasen durch Inhibitoren dieser Gruppe haben ein Aktivitätsmaximum bei einem leicht sauren pH-Wert (6,0 – 7,0). Das Aktivitätsmaximum der sauren Kartoffelinvertase und ihres Inhibitors liegt bei einem pH-Wert von 4,6 (Pressey, 1968). Für Serin Proteasen, welche ebenfalls durch Vertreter dieses Inhibitor Typs inhibiert werden, liegt dieses pH-Optimum allerdings im alkalischen Bereich (pH 7,5). Im Alkalischen ist der native Invertase-Inhibitor nach Pressey (1967, 1968) nicht stabil.

Allein aus den Daten, die aus den Inhibitorsequenzen abgeleitet werden können, kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden, ob sich ein dem Invertase-Inhibitor entsprechender Klon unter den “Kandidaten” befindet. Die gefundenen Daten können jedoch darauf hinweisen, dass die vorliegenden Klone keine Invertase-Inhibitoren sind.

4.2 Funktionelle Analyse von Kunitz Typ Inhibitoren

4.2.1 Heterologe Expression von Kunitz Typ Inhibitor-Fusionsproteinen in *S. pombe*

Zur Charakterisierung der biologischen Aktivität der Kunitz Typ Inhibitorproteine wurden diese im heterologen System *S. pombe* als GST- oder His-Tag-Fusionsproteine exprimiert (3.2.1, 3.2.4). Unter den zahlreichen Expressionssystemen, welche zur Verfügung standen, erschien dieses eukaryotische System am geeignetsten. *S. pombe* ist in Eigenschaften wie der Codonverwendung und posttranslationalen Modifizierungen von Proteinen höheren Eukarionten wie Pflanzen ähnlicher als beispielsweise die Hefe *S. cerevisiae* (Moreno *et al.*, 1991, Alfa *et al.*, 1993, Forsburg, 1997, Hosfield und Lu, 1999. In einer früheren Arbeit war bereits durch Dr. H. Glaczinski versucht worden, die Klone 1421 und 1422 in *E. coli* zu exprimieren (unveröffentlichte Daten). Aus den dabei in *E. coli* entstandenen “Inclusion Bodies” konnte jedoch kein biologisch aktives Protein gewonnen werden. In verschiedenen Publikationen wird von der erfolgreichen Expression von Pflanzenproteinen in *S. pombe* berichtet (Lodenkötter *et al.*, 1993, Lu *et al.*, 1997), weshalb dieses Expressionssystem in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

4.2.2 Inhibierung von Kartoffelinvertase

Die Inhibitoren 1421.C und 1422.C, welche von Dr. H. Glaczinski als mögliche Invertase-Inhibitorgene isoliert worden waren (unveröffentlichte Daten), wurden als GST- und His-Tag-Fusionsproteine in *S. pombe* exprimiert und mithilfe von Affinitätschromatographischen Methoden (3.2.2, 3.2.5) aufgereinigt. Die Enterokinase-Spaltprodukte der Fusionsproteine GST-1421.C und GST-1422.C sowie die entsprechenden His-Tag Fusionsproteine zeigten bei der Auftrennung in einer denaturierenden SDS-PAGE bzw. bei der Immunodetektion (Abb. 3.14, 3.16, 3.17, 3.18) Banden bei 21 – 22 kD. Damit erschienen sie etwas größer als die nach der Aminosäuresequenz berechneten relativen Molekulargewichte (Tab. 3.2). Das von Dr. H. Glaczinski aus Kartoffelknollen isolierte Protein, welches für die partielle, N-terminale

Sequenzierung verwendet wurde, hatte eine Größe von 24 kD. Zwar wurden in dieser Arbeit mehrere Proteinbanden zwischen 19 und 25 kD isoliert, die maximale Invertase-Inhibitoraktivität war jedoch mit der 24 kD-Bande assoziiert. In verschiedenen anderen Arbeiten wird der aus Kartoffelknollen aufgereinigte Invertase-Inhibitor als ein Protein von 17 kD beschrieben (Pressey und Shaw, 1966, Pressey, 1967, Bracho und Whitaker, 1990a, b). Die Größenunterschiede zwischen den berechneten Molekulargewichten, den in *S. pombe* exprimierten Proteinen und dem von Dr. H. Glaczinski aufgereinigten Protein können durch Effekte bei der Elektrophorese wie verschiedene Laufbedingungen oder ein anderes Laufverhalten gegenüber der Theorie durch die räumliche Struktur des Proteins verursacht worden sein. Bei dem in anderen Arbeiten beobachteten 17 kD-Protein handelt es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt oder ein anderes Protein.

Weder das GST-Fusionsprotein, noch die Enterokinase-Spaltprodukte oder die His-Tag-Fusionsproteine zeigten eine Kartoffelinvertase inhibierende Wirkung (3.3.1). Dies kann verschiedene Ursachen haben. Es ist möglich, dass das in *S. pombe* exprimierte Protein nicht "richtig" gefaltet wird und somit nicht die zur Inhibierung von Invertase notwendige Sekundärstruktur ausbildet. Das native Invertase-Inhibitorprotein ist nicht glykosiliert (Pressey, 1968, Bracho und Whitaker, 1990). Über weitere mögliche posttranslationale Modifizierungen, welche eventuell von *S. pombe* nicht durchgeführt werden, ist nichts bekannt. Das 27 kD große GST-Tag kann möglicherweise eine korrekte Faltung des Proteins verhindern oder die Reaktion mit der Invertase behindern, bei dem sehr kleinen His-Tag ist dies jedoch eher unwahrscheinlich. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Fusionsproteine während der affinitätschromatographischen Aufreinigung ihre Invertase inhibierende Aktivität verloren haben. Zwar wurde die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine weitgehend bei einem pH-Wert von 4,6 durchgeführt, bei dem der native Invertase-Inhibitor seine maximale Aktivität besitzt (Pressey, 1967, 1968) und die Aufreinigung aus Kartoffelknollen durchgeführt wird. Um eine Bindung der Fusionsproteine an die Säulenmatrix zu ermöglichen, war jedoch ein kurzzeitiges Anheben des pH-Wertes auf 8,0 erforderlich. Hierbei ging möglicherweise die Invertase inhibierende Aktivität, etwa durch eine Veränderung der Sekundärstruktur, verloren. Die Aufreinigung der His-Tag Fusionsproteine mithilfe einer nativen Methode war nicht möglich, da das His-Tag offenbar nicht auf der Proteinoberfläche für die an der Gelmatrix gebundenen Nickelionen zugänglich war (3.2.5). Das denaturierte Fusionsprotein His-1422 konnte mithilfe

der Gelmatrix aufgereinigt werden, blieb nach der Renaturierung in Lösung und hatte anschließend noch eine Größe von 21 – 22 kD. Es ist jedoch möglich, dass das Protein bei der Renaturierung nicht richtig gefaltet wurde (Buchner und Rudolph, 1991). Ewing und McAdoo (1971) sowie Bracho und Whitaker (1990, a, b) beschreiben, dass das native Inhibitorprotein empfindlich auf pH-Änderungen reagiert und im alkalischen Bereich rasch seine Aktivität verliert. Es ist also möglich, dass der Invertase-Inhibitor nicht als aktives Protein in einem heterologen System exprimiert werden kann oder eine Extraktion aus einem solchen nur bei strikter Beibehaltung des pH-Wertes von 4,6 möglich ist. In diesem Fall ist eine affinitätschromatographische Aufreinigung mithilfe eines GST- oder His-Tags jedoch nicht möglich.

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der Kunitz Typ Inhibitoren, welche in der EST-Bibliothek gefunden wurden, erwiesen sich sechs weitere Inhibitorsequenzen als mögliche Kandidaten für das Invertase-Inhibitorgen. Sie alle besitzen die strukturellen Merkmale durch die sich auch die Sequenzen von 1421.C und 1422.C von den übrigen Vertretern der Gruppe unterscheiden (3.1.5, 4.1.2). Somit ist es möglich, dass es sich bei einem der hier nicht weiter untersuchten Klone um den Invertase-Inhibitor handelt.

Greiner et al. (1999) isolierten einen 17 kD großen Invertase-Inhibitor aus Tabakpflanzen und zeigten, dass dieser Kartoffelinvertase inhibiert. Die Aminosäuresequenz dieses Protein hat jedoch keine Homologie zu den in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren und weist keine Merkmale eines Kunitz Typ Inhibitors auf.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es nicht möglich, den untersuchten Inhibitoren eine Funktion als Invertase-Inhibitor zuzuschreiben, es besteht jedoch weiterhin die Möglichkeit, dass einer der nun acht Kandidaten diese Aktivität in Kartoffelknollen besitzt.

4.2.3 Inhibierung von Proteasen

Zur Untersuchung funktioneller Unterschiede zwischen den drei Gruppen von Kunitz Typ Inhibitorproteinen und zur Charakterisierung von Unterschieden innerhalb der Gruppen wurden in *S. pombe* exprimierte GST-Fusionsproteine von neun Inhibitoren auf Inhibierung verschiedener Proteasen getestet (3.3.2). Durch die Expression der Inhibitorsequenzen in einem

heterologen System bot sich die Möglichkeit, sehr ähnliche Inhibitorproteine in hoher Konzentration herzustellen und ihre biologische Aktivität zu vergleichen. Da in Kartoffelknollen eine hohe Anzahl einander sehr ähnlicher Kunitz Typ Inhibitoren enthalten ist (Abb. 3.2, 3.3, 3.4), ist es praktisch unmöglich, einen nativen Inhibitor in Reinform zu extrahieren. Ishikawa *et al.* (1994) konnten 16 verschiedene native Kunitz Typ Inhibitorproteine aus Kartoffelknollen durch chromatographische Methoden auftrennen. Dabei gelang jedoch lediglich der Nachweis von 16 von ihrem Elutionsverhalten bei der Chromatographie her unterschiedlichen Inhibitortypen. Die Proteine waren von Menge und Reinheit her für funktionelle Analysen nicht ausreichend. In dieser Arbeit wurden aus den aus der EST-Bibliothek verfügbaren vollständigen Aminosäuresequenzen verschiedene Vertreter mit Unterschieden wie nicht-konservativen Aminosäuresubstitutionen in *S. pombe* Exprimiert und verglichen.

Die meisten Inhibitor-Fusionsproteine der Gruppen A und B (GST-P1E9.A, GST-P4E1.A, GST-P1D4.B, GST-P1H5.B, GST-P4B1.B) inhibierten Trypsin deutlich stärker als Vertreter der Gruppe C. Dies entspricht der Feststellung, dass alle hier untersuchten Vertreter der Gruppen A und B ein vollständiges aktives Zentrum zur Hemmung von Trypsin (Suh *et al.*, 1991) aufweisen (4.1.1). GST-P2B11.A inhibiert Trypsin hingegen nicht stärker als Vertreter der Gruppe C. Dies weist zusammen mit einigen nicht-konservativen Aminosäuresubstitutionen sowie einer bei den anderen Vertretern nicht vorhandenen N-Glykosilierungsstelle (Stryer, 1990, Ishikawa *et al.*, 1994) auf eine mögliche andere Funktion des Protein hin. Walsh und Twitchell (1991) verglichen die Inhibierung verschiedener Proteasen durch zwei aus Kartoffelknollen aufgereinigten Inhibitoren der Gruppen B und C miteinander. Die dabei eingesetzten Konzentrationen von Enzym und Inhibitor sind mit den in dieser Arbeit verwendeten vergleichbar. Sie bestimmten 25 bzw. 40 N-terminale Aminosäuren zur Charakterisierung der Sequenzen, so dass es sich bei den Inhibitoren auch um Mischungen ähnlicher Inhibitoren handeln konnte. Auch hier wurde für einen Inhibitor der Gruppe B eine starke, für Gruppe C eine schwächere Hemmung von Trypsin festgestellt. Die Autoren stellten weiterhin für den Inhibitor der Gruppe B eine schwache (25 %), für den Vertreter der Gruppe C eine stärkere (65 %) Hemmung von α -Chymotrypsin fest. In dieser Arbeit wurde eine starke Hemmung (65 %) von α -Chymotrypsin für GST-P4E1.A und eine fast vollständige (80 %) GST-P1H5.B beobachtet (Tab. 4.4). Da Walsh und Twitchell jedoch nicht die vollständigen

Sequenzen kannten, kann nicht festgestellt werden, inwieweit sich die von Walsh und Twitchell aus Kartoffelknollen isolierten Inhibitoren von den hier charakterisierten unterscheiden. Für die hier untersuchten drei Vertreter der Gruppe C wurde keine Inhibierung von α -Chymotrypsin beobachtet. Das von Suh *et al.* (1991) charakterisierte mögliche aktive Zentrum zur Hemmung von α -Chymotrypsin ist jedoch nur bei den in dieser Arbeit verglichenen Inhibitoren der Gruppe C zu finden. Dies weist auf die Existenz einer weiteren, bei der Inhibierung von α -Chymotrypsin aktiven Region hin. Subtilisin, für das in dieser Arbeit kein Inhibitor gefunden wurde, konnte bei Walsh und Twitchell durch den Inhibitor der Gruppe C inhibiert werden. Da die in dieser Arbeit analysierten Inhibitoren dieser Gruppe keine entsprechende Aktivität zeigten, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass Inhibitoren einer Gruppe nicht nur die gleichen Enzyme in unterschiedlicher Stärke hemmen, sondern dass einzelne Vertreter auch verschiedene Proteasen inhibieren können. Dies wird dadurch bestätigt, dass α -Chymotrypsin nur durch GST-P4E1.A und GST-P1H5.B und Aspergillopepsin I nur durch GST-P1E9.A (Abb. 3.24) inhibiert wurde. Insgesamt kann also festgestellt werden, dass zumindest in Bezug auf die Hemmung von Proteasen deutliche funktionelle Unterschiede zwischen sehr ähnlichen Kunitz Typ Inhibitoren bestehen können. Sehr genau sind Unterschiede bezüglich der Affinität eines Inhibitors zu einer Protease durch die Berechnung einer Inhibitorkonstante darzustellen, da zur Berechnung dieser Konstante nur der lineare Teil einer Inhibierungskurve berücksichtigt wird. Je größer der berechnete (oder extrapolierte) Wert ist, desto schneller bindet ein Inhibitor an eine Protease (Abb. 3.26). Die Inhibitor-Fusionsproteine GST-1421.C und GST-1422.C inhibierten keine der hier getesteten Proteasen. Möglicherweise haben diese Proteine in der Pflanze eine andere Funktion, nämlich wie in 4.2.2 diskutiert, die Inhibierung von Invertase oder anderer Enzyme.

Eine Inhibierung in einem molaren Verhältnis von Inhibitor zu Protease von 1 : 1 konnte nur bei der Trypsininhibierung für einige Vertreter festgestellt werden (Tab. 3.4). Bei allen Inhibitor-Fusionsproteinen der Gruppe B war diese Reaktion also sehr spezifisch, da je ein Inhibitormolekül mit je einem Proteasemolekül reagierte. Dagegen könnte die Trypsininhibierung durch Inhibitoren der Gruppe C zumindest teilweise auf Mengeneffekte zurückzuführen sein. α -Chymotrypsin wurde von GST-P4E1.A und GST-P1H5.B erst bei einem höheren Inhibitoranteil stark inhibiert. Dies stellten auch Suh *et al.* (1991) fest, die einen Inhibitor beschreiben, der α -Chymotrypsin erst bei einem molaren Verhältnis von 5 : 1 hemmt.

Die Spezifität der in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren zu den Proteasen könnte nach Abspaltung des GST-Tags höher sein, wie es für das Fusionsprotein GST-P1H5.B gezeigt wurde (Abb. 3.25). Dabei konnte vor allem zur Papain eine deutlich höhere Affinität beobachtet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch das GST-Tag, welches etwas größer ist als das Inhibitorprotein, die Bindung an die Protease behindert wird. Dass dieser Effekt bei Papain stärker ausgeprägt ist könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich das aktive Zentrum zur Inhibierung dieser Protease näher am N-Terminus befindet, an dem sich auch das GST-Tag befindet.

Für die hier untersuchten Kunitz Typ Enzyminhibitoren konnte gezeigt werden, dass sie die getesteten Proteasen in sehr unterschiedlichem Maße hemmen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass angesichts der großen Anzahl noch nicht untersuchter Inhibitoren dieser Familie das Spektrum an Proteasen oder anderen Enzymen, welche inhibiert werden können, noch viel größer ist. Für die Kartoffelpflanze bietet diese große Bandbreite an Inhibitoren einen Schutz gegen zahlreiche Fraßinsekten (Linthorst, 1991, Boulter, 1993, Schuler, 1998) und möglicherweise auch gegen Pathogene wie mikrobielle Pilze. Eine große Anzahl unterschiedlicher Inhibitoren ist dabei von Vorteil, da zahlreiche Insekten und pathogene Pilze sich an einzelne Inhibitoren anpassen können und diese dadurch unwirksam werden (Jach, 1995, Jongsmaa, 1997, Marchetti *et al.*, 2000).

4.2.4 Inhibierung des Mycelwachstums mikrobieller Pilze

Die Funktion von Kunitz Typ Protease Inhibitoren in Blättern, Samen und Speicherorganen von Pflanzen bei der Abwehr von Fraßinsekten wurde für zahlreiche Arten von verschiedenen Autoren beschrieben (Ryan, 1990, Boulter, 1993, Gatehouse *et al.*, 1997, 1999, Jongsma und Bolter, 1997, Lecardonnel *et al.*, 1999). Über die Funktion von Kunitz Typ Inhibitoren bei der Abwehr von Pathogenen wie Viren oder mikrobiellen Pilzen ist bislang wenig beschrieben. Graham *et al.* (1999) beschreiben einen 21 kD großen Kunitz Typ Trypsininhibitor, welcher in der Sojabohne eine Funktion bei der Abwehr von *Phytophthora sojae* besitzt. Eine Infektion von Tabak mit dem Tabakmosaikvirus induziert die Synthese eines 26,7 kD großen Proteins, das

Sequenzhomologie zum Cystein Proteaseinhibitor besitzt und ein Signalpeptid und eine Signal zum Transport in die Vakuole wie einige Kunitz Typ Inhibitoren aufweist (Park *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Kunitz Typ Inhibitor-Fusionsproteine der verschiedenen Gruppen ausgewählt, um zu überprüfen, ob und in welchem Maße sie das Wachstum von mikrobiellen Pilzen beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass GST-Fusionsproteine mit Kunitz Typ Proteaseinhibitoren aus Kartoffelknollen das Mycelwachstum des mikrobiellen Pilzes *Fusarium moniliforme*, welcher für Getreide pathogen ist (Guo *et al.*, 1997), *in vitro* hemmen (3.3.5). Die stärkste Inhibierung des Mycelwachstums konnte bei einem Inhibitor-Fusionsprotein der Gruppe A, GST-P2B11.A sowie einem Inhibitor der Gruppe B, GST-P1H5.B, beobachtet werden (Abb. 3.26, Tab. 3.5). GST-P4E1.A, ein weiterer Vertreter der Gruppe A, zeigte bei gleichen Konzentrationen einen deutlich geringeren Hemmeffekt, was auf Unterschiede innerhalb einer Gruppe bezüglich der Inhibierung hindeutet. Dies ist möglicherweise auf zahlreiche nicht-konservative Substitutionen von Aminosäuren zwischen GST-P2B11.A und GST-P4E1.A (Abb. 3.2) zurückzuführen. Ein Vertreter der Gruppe C, GST-1423.GST zeigte die geringsten inhibitorischen Effekte, was auch hier wie bereits bei den Versuchen zur Inhibierung von Proteasen (3.3.2) einen deutlichen Unterschied in der biologischen Aktivität von Inhibitoren verschiedener Gruppen zeigt. Neben der unterschiedlichen Inhibierung von *F. moniliforme* durch verschiedene Inhibitoren konnte auch festgestellt werden, dass die mikrobiellen Pilze *F. culmorum*, *F. naganai* und *Neurospora crassa* unter gleichen Versuchsbedingungen (Broekart *et al.*, 1990) nicht in ihrem Wachstum beeinflusst wurden. Dies deutet auf eine gewisse Spezifität der Inhibitoren P1H5.B und P2B11.B bezüglich der Inhibierung des Mycelwachstums von *F. moniliforme* hin. Ein Einfluss des GST-Tags konnte durch ein Kontrollexperiment (Tab. 3.5) ausgeschlossen werden. Salze, welche das Wachstum von Pilzmycel hemmen können, waren aus den Proteinproben entfernt worden.

Versuche anderer Autoren zur Inhibierung des Mycelwachstums mikrobieller Pilze durch Kunitz Typ Inhibitoren sind nicht bekannt. Chen *et al.* (1998) isolierten und charakterisierten ein 14 kD großes Protein aus Maiskörnern, welches keine Sequenzhomologie zu Kunitz Typ Proteaseinhibitoren besitzt und Trypsin inhibiert (Wen *et al.*, 1992). Unter ähnlichen Versuchsbedingungen und bei einer vergleichbaren Proteinkonzentration wurde das Mycelwachstum von *Aspergillus flavus* gehemmt. In einer früheren Arbeit (Guo *et al.*, 1997)

hatten die Autoren bereits die Hemmung des Mycelwachstums von *A. flavus* und *F. moniliforme* durch aufgereinigte, konzentrierte Proteinextrakte aus Maiskörnern nachgewiesen. Die hierbei verwendete Proteinkonzentration lag deutlich über der in dieser Arbeit verwendeten. Zusammen mit der Beobachtung, dass von den getesteten mikrobiellen Pilzen nur *F. moniliforme* und keiner der übrigen Vertreter eine Wachstumshemmung zeigte, spricht dies gegen einen Mengeneffekt durch eine zu hohe eingesetzte Proteinmenge und für eine spezifische Wirkung. Über den Mechanismus, welcher der Inhibierung des Mycelwachstums zugrunde liegen könnte, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Eine bei Pflanzen verbreitete Familie von Proteinen mit 45 – 54 Aminosäureresten sind die “Defensine” (“Plant Defensins”, Broekaert *et al.*, 1995, Kragh *et al.*, 1995). In einigen Arbeiten wurde gezeigt, dass diese Proteine nicht von den Pilzhyphen aufgenommen werden, sondern dass sie sehr spezifisch an Faktoren in der Membran der Pilzzellen binden und sie für Ionen durchlässig machen. Diese Wirkung wurde für “Defensine” von *Heuchera sanguinea* und *Dahlia merckii* auf Hyphen von *Neurospora crassa* beschrieben (Thevissen *et al.*, 1997, 2000). Das “Defensin” von *D. merckii* erhöhte auch die Permeabilität für Ionen bei *Saccharomyces cerevisiae* (Thevissen *et al.*, 1999). Diese Beispiele zeigen, dass Proteine mit inhibitorischer Wirkung auf das Pilzwachstum nicht unbedingt von den Hyphen aufgenommen werden müssen. Eine weitere, sehr komplexe und ebenfalls weit verbreitete Familie von Proteinen mit antimikrobieller Wirkung sind die Thionine (Stuart und Harris, 1942, Garcia-Olmedo *et al.*, 1989, Broekaert *et al.*, 1997). Diese können von Mikroorganismen aufgenommen werden und können sehr unterschiedliche Wirkungen haben, z.B. die Erhöhung der Membranpermeabilität, die Inhibierung enzymatischer Reaktionen sowie eine Beteiligung an Redoxreaktionen. In der Variabilität der Proteinstruktur sind sie den Kunitz Typ Inhibitoren vergleichbar (Garcia-Olmedo *et al.*, 1989, Epple *et al.*, 1997). Thionine können bei mikrobiellen Pilzen “Hyperbranching”-Effekte hervorrufen: die Pilzhyphen bleiben sehr kurz, verzweigen sich jedoch mit hoher Häufigkeit, wodurch kompakte “Mycelknäuel” entstehen. Dieser Effekt konnte auch bei der Inhibierung von *F. moniliforme* durch GST-P2B11.A und GST-P1H5.B beobachtet werden. Weitere Familien von Pflanzenproteinen, welche eine antimikrobielle Wirkung haben können, sind die 90 – 93 Aminosäurereste großen Lipid-Transferproteine (Molina *et al.*, 1993, Thevissen *et al.*, 1996), Chitinasen, Proteine, welche Ribosomen inaktivieren, β -1,3-Glucanasen und Proteaseinhibitoren (Vigers *et al.*, 1991). Da Kunitz Typ

Enzyminhibitoren ebenfalls in Struktur und biologischer Aktivität sehr vielfältig sind und die Mechanismen, mit denen Mikroorganismen gehemmt werden sehr unterschiedlich sein können, ist eine antimikrobielle Wirkung, wie in dieser Arbeit für die Proteine GST-P2B11.A und GST-P1H5.B auf *F. moniliforme* festgestellt wurde, durchaus wahrscheinlich.

Ob die Kunitz Typ Inhibitorproteine mit Membranfaktoren reagieren oder von den Pilzhypen aufgenommen werden, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Hierzu könnten beispielsweise Studien der Inhibierung von *F. moniliforme* durch radioaktiv markierte Proteine aufschlussreich sein. Da Inhibitor-Fusionsproteine mit einer Größe von 48 kD eingesetzt wurden, ist eine Aufnahme durch die Pilzhypen eher unwahrscheinlich. Dies wäre jedoch für kleinere Abbauprodukte, die eine spezifische biologische Aktivität behalten haben, möglich.

Eine Inhibierung von *Phytophthora infestans* durch Kunitz Typ Inhibitor-Fusionsproteine konnte nicht nachgewiesen werden (3.3.5). Guo *et al.* (1997) zeigten in einem ähnlichen Versuch, dass ein 14 kD großes Protein aus Maiskörnern, welches in Vertiefungen in festen Nährmedien aufgebracht wurde, in das Medium diffundierte und Hemmhöfe bildete, in denen kein Wachstum von *A. flavus* und *F. moniliforme* auftrat. Es ist möglich, dass das verwendete Inhibitor-Fusionsprotein aufgrund seiner Größe nicht weit genug in das Medium diffundierte oder nicht mehr aktiv war bzw. generell keine spezifische Aktivität zur Inhibierung von *P. infestans* besitzt.

4.2.5 Expression der Inhibitorklone 1421 und 1422 in transgenen Kartoffelpflanzen

Die Akkumulation der reduzierenden Zucker Glucose und Fructose in Kartoffelknollen während der Lagerung unter 8°C stellt die kartoffelverarbeitende Industrie vor große Probleme. Die bei der Verarbeitung der Kartoffeln bei hohen Temperaturen in einer Reaktion von reduzierenden Zuckern mit freien Aminosäuren entstehenden Amadori-Produkte bringen Qualitätseinbußen durch eine dunkle Färbung und einen bitteren Geschmack (1.2). Der Anstieg des Gehalts an Glucose und Fructose ist dabei im wesentlichen auf eine bei Kaltlagerung um ein Vierfaches höhere Invertaseaktivität zurückzuführen (Sasaki *et al.*, 1971, Zrenner *et al.*, 1996).

Ein möglicher Lösungsansatz dieses Problems ist die kälteinduzierte Expression eines Invertase-Inhibitors in Kartoffelknollen. Aus den möglichen Invertase-Inhibitorgenen 1421 und 1422, welche Dr. H. Glaczinski isolierte und charakterisierte (unveröffentlichte Daten), wurden zusammen mit dem kälteinduzierbaren *ci21A* Promotor (Van Berkel *et al.*, 1994, Kirch *et al.*, 1997, Schneider *et al.*, 1997) Expressionskonstrukte erstellt. Die Knollen der damit transformierten transgenen Kartoffelpflanzen wurden nach Kaltlagerung auf ihren Gehalt an Glucose und Fructose untersucht (Abb. 3.27).

Der Zuckergehalt nach Kaltlagerung lag bei den meisten Linien unter dem Wert von nicht transgenen Désirée-Kartoffeln. Bei vier von 200 Linien wurde ein sehr niedriger Gehalt an reduzierenden Zuckern von 5 – 10 % des Wertes nicht transgener Pflanzen erreicht. Zwischen transgenen Linien, welche Expressionskonstrukte der Inhibitoren 1421 und 1422 ohne oder mit Signalpeptid enthielten, und Pflanzen mit einem Antisense-Konstrukt konnte kein Unterschied festgestellt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass einige der beobachteten Ergebnisse auf aus der Transformation resultierenden Effekten wie “Silencing” oder der Beschädigung für den Zuckerhaushalt notwendiger Gene zurückzuführen sind. Aufgrund einer PSTV-Infektion der transgenen Linien musste auf eine weitere Untersuchung der Pflanzen verzichtet werden. Ob die bei einigen Pflanzen beobachteten sehr niedrigen Glucose- und Fructosekonzentrationen tatsächlich auf die kälteinduzierte Expression des Inhibitors 1421 oder 1422 zurückzuführen sind, könnte durch Expressionsanalysen oder biochemische Untersuchungen von Invertase- und Invertase-Inhibitoraktivität festgestellt werden. Dazu wäre eine Wiederholung des Experimentes notwendig.

4.3 Organisation der Inhibitorgene im Kartoffelgenom

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Inhibitorklone untereinander, die Erstellung eines Phylogramms sowie der Vergleich der Sequenzen mit Klonen aus Datenbanken und der Literatur haben eindeutig gezeigt, dass die hier untersuchten Sequenzen drei Gruppen, A, B und C bilden. Diesen drei Gruppen können unterschiedliche Gene zugeordnet werden. Dies geht aus den deutlichen Unterschieden zwischen den Gruppen in Bezug auf Sequenzhomologie, den Distanzwerten sowie der unterschiedlichen Funktionalität hervor. Desweiteren sind in

verschieden Arbeiten einzelne Inhibitoren jeder Gruppe als unterschiedliche Gene belegt (Tab. 3.2). Schwieriger zu beantworten ist die Fragestellung, wie viele verschiedene Gene jeder einzelnen Gruppe existieren. In den derzeit bekannten Arbeiten wurden in den meisten Fällen nur einzelne Inhibitoren analysiert (Suh *et al.*, 1990, 1991, Yamagishi *et al.*, 1991, Hannapel, 1994, Van Nostrand *et al.*, 1994, Strukelj *et al.*, 1995, Gruden *et al.*, 1997). Walsh und Twitchell (1991) verglichen die Sequenzen je eines isolierten Vertreters der Gruppen B und C miteinander. Sie untersuchten die Protease inhibierende Aktivität der aus Kartoffelknollen aufgereinigten Proteine und verglichen Aminosäuresequenzen aus partiellen N-terminalen Sequenzierungen mit bekannten Kunitz Typ Inhibitoren aus anderen Arten. Ishikawa *et al.* (1994) verglichen die aus DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen von je vier Vertretern der Gruppen A und B und einem Vertreter der Gruppe C miteinander und legten die Gruppeneinteilung fest, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Autoren stellten fest, dass es sich bei den Kunitz Typ Inhibitoren in der Kartoffel offenbar um eine "Multigenfamilie" handelte: Es wurde jedoch keine Aussage über die Anzahl an Genen der unterschiedlichen Gruppen gemacht.

Die vergleichsweise große Anzahl von 57 unterschiedlichen Klonen aller drei Gruppen (Abb. 3.2, 3.3, 3.4), welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ermöglicht nun eine Aussage über die Mindestanzahl von Genen. Aufgrund der Tetraploidie der Sorten Provita und Saturna, aus denen die Inhibitorsequenzen stammen, sind maximal vier Allele für jedes Gen zu erwarten. Die Anzahl verschiedener Sequenzen der drei Inhibitorgruppen lässt daher den Schluss zu, dass es für jede Gruppe mehrere Gene geben muss. Die zuverlässigste Einteilung der Gruppen A, B und C in Untergruppen, welche möglicherweise verschiedene Genkopien widerspiegeln, gibt das Phylogramm (Abb. 3.5) wieder, da für alle Verzweigungen des Baums die Bootstrap-Werte bei 1070 Wiederholungen deutlich über 50 lagen und damit als signifikant einzuordnen sind.

Für die Inhibitorgruppe C, welche den Cystein Proteaseinhibitoren zuzuordnen ist, ergeben sich aufgrund der Tetraploidie der Kartoffellinien bei 13 verschiedenen Provita-Klonen mindestens vier Genkopien und bei fünf unterschiedlichen Saturna Klonen mindestens zwei Gene. Im Phylogramm (Abb. 3.5) können hingegen sechs verschiedene Untergruppen festgestellt werden, die verschiedene Gene darstellen können. Ein Gen ist C_{PI} mit den allelischen Provita-Klonen P7D1.C, P7B11.C und P3B11.C. Die Saturna-Klone S1E3.C und S6C11.C repräsentieren

demnach Allele des entsprechenden Gens in Saturna, C_{S1} . In gleicher Weise lassen sich weitere mögliche Genkopien bestimmen: C_{P2} mit den Allelen P3A7.C und 1423.C und das entsprechende Saturna-Gen C_{S2} mit S9+11E5.C, C_{P3} mit den Allelen P3C3.C, P3C4.C, 1422.C und P4G5.C sowie C_{S3} mit dem Vertreter S5E6.C. Den möglichen Genen C_{P4} mit den Allelen P9B4.C, 1421.C und P9B1.C sowie C_{P5} mit dem Klon P7G8.C entsprechen keine EST-Klone in Saturna. Der Saturna-Klon S8+9B11.C, von dem kein Vertreter in den Provita-ESTs gefunden wurde, kann einem weiteren Gen, C_{S6} , zugeordnet werden. Die Klone P2G10.C, P2G12.C und P4A2.C werden beim Vergleich der 5'-nichttranslatierten Bereiche nach Sequenzhomologie (Abb. 3.32) der Untergruppe zugeordnet, welche möglicherweise das Gen C_{P4} repräsentiert. Da sie sich von den übrigen Klonen der Untergruppe etwas unterscheiden und zusammen mit dem Klon P3A12.C insgesamt acht Allele ergeben, ist die Existenz eines weiteren Gens, C_{P7} , wahrscheinlich. Der 5'-nichttranslatierte Bereich von P3F3.C kann dem möglichen Gen C_{P2} , der von P4B1.C kann C_{P1} zugeordnet werden, so dass C_{P1} mit vier und C_{P2} mit insgesamt drei Allelen vertreten ist. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Gruppe C (Abb. 3.4) ergibt für C_{P1} , C_{P3} und C_{P4} die gleiche Zuordnung von Inhibitorklonen wie im Phylogramm, S8+9B11 (C_{S6}) kann allein aufgrund seiner zahlreichen nicht-konservativen Substitutionen von Aminosäureresten als eigenes Gen charakterisiert werden. Die Inhibitoren 1423.C und P3A7.C (C_{P2}) sind bei dem Vergleich, anders als im Phylogramm, nicht direkt übereinander angeordnet. Die aus dem Phylogramm hervorgehende Anordnung der Inhibitorklone ist aufgrund der hohen Zahl von 1070 Wiederholungen bei der Berechnung des Baums als statistisch wesentlich genauer anzusehen als der Aminosäuresequenzvergleich. Der niedrige Distanzwert zwischen 1423.C und P3A7.C (Tab. 3.8) zeigt zudem, dass die beiden Sequenzen eine sehr hohe Homologie zueinander besitzen. Aufgrund der vorliegenden Daten kann für die Inhibitorklone der Gruppe C auf eine Anzahl von mindestens sechs verschiedenen Genkopien (C_{P1} , C_{P2} , C_{P3} , C_{P4} , C_{P5} , C_{P7}) in Provita geschlossen werden, von denen drei (C_{S1} , C_{S2} , C_{S3}) auch in Saturna gefunden wurden. Ein mögliches siebtes Gen der Gruppe, C_{S6} , kann nur für Saturna bestätigt werden. Die Southern Blot-Analyse der mit *Hind*III verdauter DNA von BAC-Klonen, welche mit einer DNA-Sonde für Gruppe C detektiert wurden, zeigt sechs verschiedene Fragmente in Gruppe C (Abb. 3.31). Aus der Addition der Fragmentgrößen, welche nach einem *Taq*I-Verdau dieser BAC-Klone mit dergleichen DNA-Sonde detektiert wurden (Tab. 3.6) ergibt sich, dass einige der *Hind*III-Fragmente wahrscheinlich mehrere

Genkopien enthalten, auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ein Teil der Inhibitorklone der Gruppe C eine interne Erkennungsstelle für *TaqI* besitzt. Insgesamt können für die Gruppe C mindestens sechs Gene postuliert werden, aufgrund der Daten aus der Analyse der mit einer DNA-Sonde für Gruppe C detektierten BAC-Klone ist die Zahl der Kopien jedoch wahrscheinlich höher.

Inhibitoren der Gruppe A, welche Homologie zum Cathepsin D-Inhibitor besitzen, wurden ausschließlich unter den Provita-Klonen gefunden. Aufgrund der Anzahl verschiedener Klone und der Tetraploidie der Kartoffellinie kann auf mindestens vier Gene geschlossen werden. Aus dem Phylogramm (Abb. 3.5) ergeben sich sechs verschiedene Untergruppen, denen mögliche Gene zugeordnet werden können. Diese Gene wären: A_{P1} mit den Allelen P2H3.A und P8G5.A, A_{P2} mit P2B4.A, A_{P3} mit den Allelen P7E9.A und P8C8.A, A_{P4} mit P1E9.A, P4F10.A und P9D7.A, A_{P5} mit P4E1.A sowie A_{P6} mit den Allelen P2B11.A und P3E3.A. Auch hier ist die Einteilung in die Untergruppen, welche einzelnen Genen entsprechen können, aufgrund der signifikant hohen Bootstrap-Werte als sehr zuverlässig anzusehen. Diese Einteilung spiegelt sich im wesentlichen im Vergleich der Aminosäuresequenzen (Abb. 3.2) wieder. A_{P5} und A_{P6} fallen dabei wegen ihrer zahlreichen nicht-konservativen Substitutionen von Aminosäureresten als wahrscheinlich eigene Gene auf. Bei der Analyse von mit *HindIII* verdauter DNA von BAC-Klonen, die mit einer für Gruppe A spezifischen DNA-Sonde detektiert wurden, wurden mithilfe eines Southern Blots sechs verschiedene Fragmente für diese Gruppe festgestellt (Abb. 3.31). Aus den vorliegenden Daten kann also geschlossen werden, dass es von Kunitz Typ Inhibitoren der Gruppe A in Kartoffelknollen ebenfalls mindestens sechs verschiedene Genkopien gibt. Aufgrund der Größen der beobachteten *HindIII*-Fragmente von 3 Kb bis zu 12 Kb ist es auch hier möglich, dass noch weitere Gene existieren.

Die Gruppe B der Kunitz Typ Inhibitoren, der die meisten Inhibitorklone zugeordnet wurden, lässt bei Betrachtung des Vergleichs der Aminosäuresequenzen (Abb. 3.3) eine geringere Einteilung in Untergruppen erkennen als die Gruppen A und C. Die Zahl von 21 Provita-Klonen lässt bei zugrunde gelegter Tetraploidie mindestens sechs Gene erwarten, die sieben Saturna Klone lassen mindestens zwei Kopien zu. Das Phylogramm (Abb. 3.5) zeigt deutliche Untergruppen, welche verschiedenen Genen entsprechen können. Sehr früh zweigt ein Ast zu den Klonen P1D4.B und P8H2.B ab, so dass diese sehr wahrscheinlich als selbständige Genkopie B_{P1} charakterisiert werden können. B_{P2} können die möglichen Allele P4B1.B,

P7C10.B und P9E5.B zugeordnet werden. B_{P2} entsprechen in Saturna die Allele S8+9C10.B und S10H10.B (B_{S2}). Weitere Untergruppen, denen verschiedene Gene zugeordnet werden können, sind B_{P3} mit den Allelen P1G7.B und P3E8.B, B_{S3} mit dem Vertreter S5G8.B, B_{P4} mit P2F10.B, B_{P5} mit P4A9.B, P7D4.B und P7D8.B, B_{P6} mit P7B12.B, B_{S6} mit den Allelen S1C1.B und S9+11E4, B_{P7} mit P1H5.B und P8E9.B, B_{P8} mit P4D11.B und P4D3.B, B_{P9} mit P1D2.B, P2G2.B und P1E11.B sowie in das mögliche Gen B_{S9} mit den Allelen S5C10.B und S7F3.B. Aufgrund der Distanzen der verschiedenen Klone zueinander im Phylogramm (Abb. 3.5) und der Sequenzhomologie können B_{P8} und B_{P9} dabei als ein Gen charakterisiert werden. Da es aber nur vier Allele je Gen geben kann, müssen die vorliegenden Sequenzen mindestens zwei Gene repräsentieren. Beim Vergleich der 3'-nichttranslatierten Bereiche der Sequenzen der Gruppe B (Abb. 3.32) sind einige mögliche Allele nicht direkt übereinander angeordnet wie im Phylogramm. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die 3'-nichttranslatierten Bereiche der Gruppe B sich weniger voneinander unterscheiden als die der anderen Gruppen. Zudem sind einige der 3'-nichttranslatierten Sequenzen sehr kurz, was zumindest teilweise auf Unvollständigkeit zurückzuführen ist. Die Zuordnung zu Untergruppen des Phylogramms ist auch hier aufgrund der hohen Anzahl an Wiederholungen bei der Berechnung und der größeren Vollständigkeit der verwendeten Aminosäuresequenzen als zuverlässiger anzusehen. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der Gruppe B (Abb. 3.3) sind einige Untergruppen, welche möglicherweise Gene darstellen, wiederzufinden, etwa B_{P1} , B_{P2} und B_{P3} . Darüber hinaus ist noch ein weiteres mögliches Gen, B_{P10} , welches im Phylogramm nicht aufgeführt ist, durch die Inhibitoren P8E10.B und P2D5.B vertreten. Diese fallen durch eine kürzere, am C-Terminus deutlich abweichende Aminosäuresequenz auf und sind deshalb sehr wahrscheinlich Allele eines weiteren Gens. Für die Inhibitoren der Gruppe B wurden also mindestens zehn mögliche Gene in Kartoffeln der Sorte Provita gefunden, von denen vier auch in Saturna nachgewiesen wurden.

Die Mindestanzahl von Genen der Multigenfamilie der Kunitz Typ Inhibitoren in Kartoffelknollen kann aufgrund der vorliegenden Daten auf 23 geschätzt werden. Dabei stammen sechs Kopien von Gruppe A, zehn von Gruppe B und sieben von Gruppe C. Die Anzahl an Allelen oder Genen kann noch höher liegen, da in der EST-Bibliothek möglicherweise nicht alle Sequenzen der Kunitz Typ Inhibitoren repräsentiert sind.

Zur Bestätigung der Anzahl an Genen müsste mithilfe der Analyse der detektierten Restriktionsverdaufragmente der BAC-Klone ein Kontig aufgestellt werden, welches durch Sequenzierungen und PCR-Reaktionen bestätigt werden müsste. In weiteren molekulargenetischen Untersuchungen dieses Kontigs könnten dann unterschiedliche Gene charakterisiert werden.

4.4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit strukturell und funktionell analysierten Kandidaten für das Invertase-Inhibitorgen können bisher noch nicht eindeutig als Invertase- oder Proteaseinhibitoren charakterisiert werden. Es gibt sowohl Merkmale, die darauf hinweisen, dass es sich um Invertase-Inhibitoren handeln könnte, als auch Merkmale, die für Proteaseinhibitoren sprechen, welche der induzierten Abwehr gegen Fraßinsekten oder Pathogene dienen. Nach dem in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzvergleich mit Kunitz Typ Inhibitoren aus einer EST-Bibliothek existieren nun acht mögliche Kandidaten für das Invertase-Inhibitorgen. Um herauszufinden, ob es sich bei einem der Kandidaten um den Invertase-Inhibitor handelt, könnten Oligonukleotide auf Basis der aus der EST-Bibliothek vorliegenden Sequenzinformationen hergestellt werden, welche unter geeigneten Bedingungen nur für jeweils einen Kandidaten ein Produkt erzeugen. RNA aus Kartoffeln, die unter Bedingungen gelagert wurden, bei denen eine hohe Invertase-Inhibitoraktivität vorliegt, könnte mithilfe dieser Oligonukleotide in Reverse-Transkriptase PCR-Reaktionen untersucht werden. Sollte sich unter den Kandidaten das richtige Gen befinden, so sollte hier bevorzugt ein Produkt entstehen.

Weiterhin müsste das Transformationsexperiment mit Kartoffelpflanzen wiederholt werden. Zusätzlich zum in dieser Arbeit verwendeten kälteinduzierbaren *ci2IA* Promoter wäre auch eine konstitutive Expression CaMV 35S Promoter denkbar um biochemische und molekulargenetische Studien durchzuführen. Diesen Ansatz verwendeten auch Greiner *et al.* (1999), welche durch Expression eines Invertase-Inhibitors aus Tabak unter Kontrolle des CaMV 35S Promoters in Kartoffelpflanzen die Invertaseaktivität deutlich senkten.

Desweiteren wäre es möglich, die Inhibitoren in einem heterologen System wie Hefe ohne einen Fusionspartner zu exprimieren und mithilfe chromatographischer Methoden unter den gleichen Bedingungen wie den nativen Invertase-Inhibitor aufzureinigen. Mit dem so gewonnenen Protein müssten dann funktionelle Tests durchgeführt werden.

Zur Analyse des Funktionsspektrums einer größeren Anzahl von Kunitz Typ Inhibitoren wäre eine Automation einer größeren Menge von Enzymtests erforderlich, um einen höheren Probendurchsatz zu erreichen. Die in dieser Arbeit für neun Inhibitoren angewendeten Methoden wären dazu zu zeitaufwendig. Solche automatisierten Enzymtests werden bei gegebener Wirtschaftlichkeit bereits in der Industrie angewendet (Mazur, 2000). Dabei ist die Expression zu untersuchender Proteine in einem heterologen System wie Hefe insbesondere bei sehr ähnlichen Sequenzen, wie in dieser Arbeit, von Vorteil.

Anwendungsmöglichkeiten von Kunitz Typ Enzyminhibitoren sind die Verwendung zur spezifischen Inhibierung von Enzymreaktionen z.B. in Forschungsarbeiten sowie eine Überexpression zur Abwehr von Fraßinsekten in Nutzpflanzen. Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung dieser Methode sind die Expression von Kunitz Typ Inhibitoren in Tabak zur Abwehr von *Spodoptera littoralis* (Marchetti *et al.*, 2000) und *Spodoptera litura* (McManus *et al.*, 1999), Schneeglöckchen-Lectin oder Proteaseinhibitoren in Tomaten zur Resistenz gegen *Lacanobia oleracea* (Gatehouse *et al.*, 1997, 1999) sowie α -Amylase-Inhibitoren aus Bohnen in Tabak gegen *Coleoptera spec.* (Schuler *et al.*, 1998). Um Resistenzen der Insekten gegen die Inhibitoren zu vermeiden, sind jedoch die Coexpression verschiedener Inhibitoren in einer Pflanze und ein wechselnder Anbau transgener und nicht-transgener Pflanzen erforderlich. Des weiteren sind Studien über Auswirkungen auf andere Organismen notwendig. So zeigten Malone *et al.* (1998), dass die Verfütterung von mit Kunitz Typ Protease Inhibitoren aus Kartoffeln vermischem Nektar an Honigbienen in einer Konzentration wie in Pollen transgener Pflanzen für die Insekten nicht schädlich ist.

5. Zusammenfassung

Aminosäuresequenzen von 57 verschiedenen Kunitz Typ Enzyminhibitoren aus Kartoffelknollen aus einer EST-Bibliothek der Sorten Provita und Saturna wurden verglichen. Aufgrund von Sequenzhomologien und nach der Erstellung eines Phylogramms konnten drei Gruppen von Inhibitoren, A, B und C, gefunden werden. Bezüglich der Homologie der Aminosäuresequenzen waren die Gruppen A und B mit mehr als 80 % (75 % identisch) einander sehr ähnlich, während die Gruppen B und C mit 46 % (38 %) und die Gruppen A und C mit 40 % (34%) einander weniger ähnlich waren. Um funktionelle Unterschiede zwischen Inhibitoren verschiedener Gruppen sowie innerhalb jeder Gruppe zu untersuchen, wurden die Sequenzen von je drei Vertretern jeder Gruppe als GST-Fusionsproteine und teilweise als His-Tag Fusionsproteine in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* exprimiert und mit affinitätschromatographischen Methoden aufgereinigt.

Unter den Inhibitoren der Gruppe C befanden sich die Vertreter 1421.C und 1422.C, welche in einer vorausgehenden Arbeit als mögliche Inhibitoren einer sauren Invertase aus Kartoffelknollen charakterisiert worden waren. Funktionelle Analysen durch Enzymtests mit den rekombinanten Proteinen aus Hefe sowie durch Expression in transgenen Kartoffelpflanzen konnten jedoch nicht klären, ob die Gene *1421.C* oder *1422.C* dem Invertase-Inhibitor entsprechen. In der EST-Bibliothek konnten sechs weitere, unterschiedliche Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche die Merkmale des möglichen Invertase-Inhibitors aufweisen.

Mit den Aufgereinigten GST-Fusionsproteinen wurden funktionelle Untersuchungen zur Inhibierung verschiedener Proteasen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Inhibitoren auch innerhalb einer Gruppe in unterschiedlichem Maße Trypsin, α -Chymotrypsin und Papain hemmten. Es wurde ein Inhibitor der Protease Aspergillopepsin I gefunden. Subtilisin wurde von keinem der Inhibitoren signifikant gehemmt. Durch kinetische Untersuchungen konnte eine unterschiedliche Affinität der Inhibitoren gezeigt und molare Verhältnisse von Inhibitor und Protease abgeschätzt werden. Ein Anstieg der Affinität des Inhibitor-Fusionsproteins zu Proteasen nach Abspaltung des GST-Tags konnte für einen Inhibitor nachgewiesen werden.

Zwei Inhibitor-Fusionsproteine der Gruppen A und B hemmten in Mikrotiterplattentests mit verschiedenen mikrobiellen Pilzen ausschließlich das Mycelwachstum von *Fusarium moniliforme*. Andere Inhibitoren inhibierten das Mycelwachstum dieses Pilzes unter gleichen Bedingungen nicht, so dass eine gewisse Spezifität vermutet werden kann.

Mithilfe von gruppenspezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde eine BAC-Bibliothek nach Klonen mit Kunitz Typ Inhibitorgenen durchsucht. Aufgrund von Restriktionsverdauanalysen von detektierten BAC-Klonen, Untergruppenbildung im Phylogramm, des Vergleichs der Aminosäuresequenzen und der 3'-nichttranslatierten Bereiche der Inhibitorklone wurde die Anzahl der unterschiedlichen Gene untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass für Inhibitoren der Gruppe A mindestens sechs, für Gruppe B mindestens 10 und für Gruppe C mindestens sieben verschiedene Gene existieren.

6. Abstract

Amino acid sequences of 57 different Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers derived from an EST library of the cultivars Provita and Saturna have been compared. Derived from sequence homology and the division into subgroups within a phylogram, three groups of inhibitors, A, B, and C were found. The amino acid sequence of group A exhibited 80 % similarity (75 % identity) to group B while the amino acid sequences of group B and C shared only 46 % similarity (38 % identity), group A and C only 40 % (34 %). To analyze functional differences of inhibitors of different groups or within a group, three representatives of each group were expressed as GST fusion proteins or His-tagged proteins in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and purified using affinity chromatography.

Inhibitors 1421.C and 1422.C, two representatives of group C, have been characterized as putative inhibitors of soluble acid tuber invertase of potato in a previous work. Functional analysis by performing enzymatic assays with the recombinant proteins and expression in transgenic potato plants could not prove the function of genes *1421.C* or *1422.C* as invertase inhibitor. Six new amino acid sequences with characteristics of the putative invertase inhibitor were identified from the EST library.

Functional analysis of protease inhibition was performed using the purified GST fusion proteins. These studies revealed different levels of inhibition of trypsin, α -chymotrypsin and papain by different inhibitors from one group. One inhibitor showed inhibition of fungal protease Aspergillopepsin I. Subtilisin was inhibited by none of the inhibitors at a significant level. Kinetic studies revealed different substrate affinity and molar ratios of inhibitors and proteases. An increase of affinity of inhibitor fusion protein and protease after cleavage of the GST-tag was demonstrated.

Two inhibitor fusion proteins of groups A and B inhibited growth of microbial fungus *Fusarium moniliforme* in antifungal growth inhibition assays using spores of different microbial fungi. A certain specificity was supposed because other inhibitors did not show inhibition of mycel growth.

A BAC library was screened for Kunitz-type inhibitor clones using group-specific probes. Analysis of restriction fragments of detected BAC clones, subgroups within the phylogram and comparison of amino acid sequences and the 5'-untranslated regions of the inhibitor clones

revealed a minimum number of different genes. A number of at least six putative genes of group A, ten of group B, and seven of group C were found.

7. Literaturverzeichnis

- ALFA, C., FANTES, P., HYAMS, J., MCLEOD, M., AND WARBRICK, E.** (1993) Experiments with fission yeast: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 1-10
- ALTING-MEES, M., SORGE, J.A., AND SHORT, J.M.** (1992) Methods in Enzymology. Wu, R.: Ed. Methods in Enzymology; Recombinant DNA, Part G. 2161992: 483-495
- APPEL, R.D., BAIROCH, A., AND HOCHSTRASSER, D.F.** (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 258-260
- BOHAC, J.R.** (1991) A modified method to purify patatin from potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1411-1415
- BOWMAN, D.E.** (1946) Differentiation of soybean antitrypsin factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **63**: 547-550
- BOULTER, D.** (1993) Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry* **34**: 1453-1466
- BRACHO, G.E., AND WHITAKER, J.R.** (1990a) Characteristics of the inhibition of potato (*Solanum tuberosum*) invertase by an endogenous proteinaceous inhibitor in potatoes. *Plant Physiol.* **92**: 381-385
- BRACHO, G.E., AND WHITAKER, J.R.** (1990b) Purification and partial characterization of potato (*Solanum tuberosum*) invertase and its endogenous proteinaceous inhibitor. *Plant Physiol.* **92**: 386-394

- BRANDT, A., SVENDSEN, I., AND HEJGAARD, J.** (1990) A plant serpin gene. Structure, organization and expression of the gene encoding barley protein Z₄. *European J. Biochem.* **194**: 499-505
- BROEKAERT, W.F., TERRAS, F.R.G., CAMMUE, B.P.A., AND VANDERLEYDEN, J.** (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**: 55-60
- BROEKAERT, W.F., TERRAS, F.R.G., CAMMUE, B.P.A., AND OSBORN, R.W.** (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108**: 1353-1358
- BROEKAERT, W.F., CAMMUE, B.P.A., DE BOLLE, M.F.C., THEVISSSEN, K., DE SAMBLANX, G.W., AND OSBORN, R.W.** (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**: 297-323
- BUCHNER, J., AND RUDOLPH, R.** (1991) Renaturation, purification and characterization of recombinant F_{ab}-fragments produced in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **9**: 157-162
- BURCH, L.R., DAVIES, H.V., CUTHBERT, E.M., MACHRAY, G.C., HEDLEY, P., AND WAUGH, R.** (1992) Purification of soluble invertase from potato. *Phytochemistry* **31**: 1901-1904
- BURTON, W.G.** (1969) The sugar balance in some British potato varieties during storage. II. The effects of tuber age, previous storage temperature and intermittent refrigeration upon low-temperature sweetening. *Eur. Potato J.* **12**: 81-95
- CHAPMAN, G.W.** (1987) A proteinaceous competitive inhibitor of lipase isolated from *Helianthus annuus* seeds. *Phytochemistry* **26**: 3127-3131

- CHEN, Z.Y., BROWN, R.L., LAX, A.R., GUO, B.Z., CLEVELAND, T.E., AND RUSSIN, J.S.** (1998) Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14-kDa protein. *Phytopathology* **88**: 276-281
- DEVENEUX, J., HAEBERLI, P., AND SMITHIES, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programmes for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**: 387-395
- DIXON, W.L., AND APREES, T.** (1980) Carbohydrate metabolism during cold-induced sweetening of potato tubers. *Phytochemistry* **19**: 1653-1656
- DOWER, W.J., MILLER, J.F., AND RAGSDALE, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145
- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C., AND THOMPSON, C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1349
- EPPEL, P., APEL, K., AND BOHLMANN, H.** (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**: 509-520
- EWING, E.E., MCADOO, M.H.** (1971) An examination of methods used to assay potato tuber invertase and its naturally occurring inhibitor. *Plant Physiol.* **48**: 366-370
- EWING, E.E., SENESAC, A.H., AND SIECZKA, J.B.** (1981) Effects of short periods of chilling and warming on potato sugar content and chipping quality. *American Potato J.* **58**: 633-647
- FARMER, E.E., JOHNSON, R.R., AND RYAN, C.A.** (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **98**: 995-1002

- FEINBERG, A.P., AND VOGELSTEIN, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13
- FEINBERG, A.P., AND VOGELSTEIN, B. (1984) Add to 1983; *Anal. Biochem.* **137**: 266-267
- FORSBURG, S.L. (1993) Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucl. Acids Res.* **21**: 2955-2956
- FORSBURG, S.L., AND SHERMAN, D.A. (1997) General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene* **191**: 191-195
- FROMMER, W.B., SONNEWALD, U. (1995) Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *J. Exp. Bot.* **46**: 587-607
- GARCIA-OLMEDO, P., RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., HERNÁNDEZ-LUCAS, C., PONZ, F., MARAÑA, C., CARMONA, M.J., LOPEZ-FANDO, J., FERNANDEZ, J.A., AND CARBONERO, P. (1989) The thionins: a protein family that includes purothionins, viscotxins and crambins. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology* **6**: 31-60
- GARGOURI, Y., JULIEN, R., PIERONI, G., VERGER, R., AND SARDA, L. (1984) Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *J. Lipid Res.* **25**: 1214-1221
- GATEHOUSE, A.M.R., DAVISON, G.M., NEWELL, C.A., MERRYWEATHER, A., HAMILTON, W.D.O., BURGESS, E.P.J., GILBERT, R.J.C., AND GATEHOUSE, J.A. (1997) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol. Breeding* **3**: 49-63
- GATEHOUSE, A.M.R., NORTON, E., DAVISON, G.M., BABBÉ, S.N., NEWELL, C.A., AND GATEHOUSE, J.A. (1999) Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth,

- Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. *J. Insect Physiol.* **45**: 545-558
- GEBHARDT, C., RITTER, E., DEBENER, T., SCHACHTSCHABEL, U., WALKEMEIER, B., UHRIG, H., AND SALAMINI, F.** (1989) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 65-75
- GRAHAM, T.L., PARK, D.S., AND GRAHAM, M.Y.** (1999) Role of Kunitz trypsin inhibitor in conditioning defense potential in soybean. *Phytopathology* **89** (Supl.): 29
- GREINER, S., KRAUSGRILL, S., AND RAUSCH, T.** (1998) Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor: proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol.* **116**: 733-742
- GREINER, S., RAUSCH, T., SONNEWALD, U., AND HERBERS, K.** (1999) Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nature Biotech.* **17**: 708-711
- GRUDEN, K., STRUKELJ, B., RAVNIKAR, M., POLJSK-PRIJATELJ, M., MAVRIC, I., BRZIN, J., PUNGERCAR, J., AND KREGAR, I.** (1997) Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterization and immunocytochemical localization studies. *Plant Mol. Biol.* **34**: 317-323
- GRUDEN, K., STRUKELJ, B., POPOVIC, T., LENARCIC, B., BEVEC, T., BRZIN, J., KREGAR, I., HERZOG-VELIKONJY, J., STIEKEMA, W.J., BOSCH, D., AND JONGSMA, M.A.** (1998) The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 549-560
- GUO, B.Z., CHEN, Z.Y., BROWN, R.L., LAX, A.R., CLEVELAND, T.E., RUSSIN, J.S., MEHTA, A.D., SELITRENNIKOFF, C.P., AND WIDSTROM, N.W.** (1997) Germination induces accu-

- mulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology* **87**: 1174-1178
- HALAYKO, A.J., HILL, R.D., AND SVENSSON, B.** (1986) Characterisation of the interaction of barley α -amylase II with an endogenous α -amylase inhibitor from barley kernels. *Biochim. Biophys. Acta* **873**: 91-101
- HAMMOND, J.B.W., BURREL, M.M., KRUGER, V.J.** (1990) Effect of low temperature on the activity of phosphofructokinase from potato tubers. *Planta* **180**: 613-616
- HANAHAN, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- HANNAPEL, D.J.** (1994) Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 22-kilodalton cathepsin D inhibitor protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Plant Physiol.* **101**: 703-704
- HOSFIELD, T., AND LU, Q.** (1999) *S. pombe* expression vector with 6x(His) tag protein purification and potential for ligation-independent cloning. *BioTechniques* **27**: 58-60
- HUANG, A.H.C., AND WANG, S.M.** (1992) Proteinaceous inhibitors of lipases in soybean and other oil seeds. In: *Seed analysis*, eds. Linskens, H.F., and Jackson, J.F. Springer-Verlag, Berlin: 263-271
- ISHERWOOD, F.A.** (1973) Starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **12**: 2579-2591
- ISHIKAWA, A., OHTA, S., MATSUOKA, K., HATTORI, T., AND NAKAMURA, K.** (1994) A Family of potato genes that encode Kunitz-Type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant Cell Physiol.* **35**: 303-312

- JACH, G., GÖRNHARDT, B., MUNDY, J., LOGEMANN, J., PINSDORF, E., LEAH, R., SCHELL, J., AND MAAS, C.** (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**: 97-109
- JAYNES, T.A., AND NELSON, O.E.** (1971) An invertase inactivator in maize endosperm and factors affecting inactivation. *Plant Physiol.* **47**: 629-634
- JONGSMA, M.A., AND BOLTER, C.** (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* **43**: 885-895
- KIRCH, H.H., VAN BERKEL, J., GLACZINSKI, H., SALAMINI, F., AND GEBHARDT, C.** (1997) Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Plant Mol. Biol.* **33**: 897-909
- KNEEN, E., SANDSTEDT, R.M.** (1943) An amylase inhibitor from certain cereals. *J. American Chem. Soc.* **65**: 1247
- KORTT, A.A., STRIKE, P.M., AND DE JERSEY, J.** (1989) Amino acid sequence of a crystalline seed albumin (winged bean albumin-1) from *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. Sequence similarity with Kunitz-type seed inhibitors and 7S storage globulins. *European J. Biochem.* **181**: 403-408
- KRAGH, K.M., NIELSEN, J.E., NIELSEN, K.K., DREBOLDT, S., AND MIKKELSEN, J.D.** (1995) Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 424-434
- KRAUSGRILL, S., GREINER, S., KÖSTER, U., VOGEL, R., AND RAUSCH, T.** (1998) In transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase. *Plant J.* **13**: 275-280

- KREITMAN, M., AND AQUADE, M.** (1986) Genetic uniformity in two populations of *Drosophila melanogaster* as revealed by four-cutter filter hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3562-3566
- KRISHNAN, H.B., AND PUEPPKE, S.G.** (1990) Cherry fruit invertase: partial purification, characterization and activity during fruit development. *J. Plant Physiol.* **135**: 662-666
- KRIZAJ, I., DROBNIC-KOSOROK, M., BRZIN, J., JERALA, R., AND TURK, V.** (1993) The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Lett.* **333**: 15-20
- KUNITZ, M.** (1945) Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* **101**: 668-669
- LAEMMLI, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LAIRON, D., BOREL, P., TERMINE, E., GRATAROLI, R., CHABERT, C., AND HAUTON, J.C.** (1985) Evidence for a proteinic inhibitor of pancreatic lipase in cereals, wheat bran and wheat germ. *Nutrition Reports International* **32**: 1107-1113.
- LECARDONNEL, A., CHAUVIN, L., JOUANIN, L., BEAUJEAN, A., PRÉVOST, G., AND SANGWAN-NORREEL, B.** (1999) Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Science* **140**: 87-98
- LINTHORST, H.J.M.** (1991) Pathogenesis-related proteins in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**: 123-150
- LODENKÖTTER, B., KAMMERER, B., FISCHER, K., AND FLÜGGE, U.I.** (1993) Expression of the functional mature chloroplast triose phosphate translocator in yeast internal membranes and purification of the histidine-tagged protein by a single metal-affinity chromatography step. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2155-2159

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., AND RANDALL, R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- LU, Q., BAUER, J.C., AND GREENER, A.** (1997) Using *Schizosaccharomyces pombe* as a host for expression and purification of eukaryotic proteins. *Gene* **200**: 135-144
- MAILLARD, L.C.** (1912) Action des acides amines sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique. *C. R. Acad. Sci.* **154**: 66-68
- MAKKAR, H.P.S., SHAMA, O.P., PAL, R.N., AND NEGI, S.S.** (1980) In vitro inhibition of rumen urease by melon (*Cucumis melo*) seed urease inhibitor. *J. Dairy Sci.* **63**: 785-788
- MALONE, L.A., BURGESS, E.P.J., CHRISTELLER, J.T., AND GATEHOUSE, H.S.** (1998) In vivo response of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *J. Insect Physiol.* **44**: 141-147
- MANIATIS, T., FRISCH, E.F., AND SAMBROOK, J.** (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press / NY
- MANIATIS, T., FRISCH, E.F., AND SAMBROOK, J.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press / NY
- MARCHETTI, S., DELLEDONNE, M., FOGHER, C., CHIABÁ, C., CHIESA, F., SAVAZZINI, A., AND GIORDANO, A.** (2000) Soybean Kunitz, C-II and PI-IV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 519-526
- MARES, R., MELOUN, B., PAVLIK, M., KOSTKA, V., AND BAUDYS, M.** (1989) Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* **251**: 94-98

- MATSUOKA, K., MATSUOMO, S., HATTORI, T., MACHIDA, Y., AND NAKAMURA, K.** (1990) Vacuolar targeting and post-translational processing of the precursor to the sweet potato tuberous rootstorage protein in heterologous plant cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 19750-19757
- MATSUOKA, K., AND NAKAMURA, K.** (1991) Propeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 834-838
- MAUNDRELL, K.** (1990) nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J. Biol. Chem.* **265**: 10857-10864
- MAUNDRELL, K.** (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**: 127-130
- MAZUR, B.J., DUPONT AGRICULTURAL ENTERPRISE, WILMINGTON, USA** (2000) Discovering and developing grains with improved quality traits. *Biotechnology 2000, The World Congress on Biotechnology, 11th International Biotechnology Symposium and Exhibition*, 3. – 8. September 2000, Berlin
- MCMANUS, M.T., BURGESS, E.P.J., PHILIP, B., WATSON, L.M., LAING, W.A., VOISEY, C.R., AND WHITE, D.W.R.** (1999) Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: effects on larval development of *Spodoptera litura*. *Transgen. Res.* **8**: 383-395
- MENEGATTI, E., TEDESCHI, G., RONCHI, S., BORTOLOTTI, F., ASCENZI, P., THOMAS, R.M., BOLOGNESI, M., AND PALMIERI, S.** (1992) Purification, inhibitory properties and amino acid sequence from white mustard (*Sinapis alba* L.) seed. *FEBS Lett.* **301**: 10-14
- MOLINA, A., GOY, P.A., FRAILE, A., SANCHEZ-MONGE, R., AND GARCIA-OLMEDO, F.** (1993) Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant J.* **4**: 983-991

- MORENO, S., KLAR, A., AND NURSE, P.** (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**: 795-823
- MÜLLER-THURGAU, H.** (1882) Über Zuckerrücklage in Pflanzentheilen in Folge niedrigerer Temperatur. *Landwirtsch. Jahrb. Schweiz* **11**: 751-828
- MUKHOPADHYAY, D.** (2000) The molecular evolutionary history of a winged bean α -chymotrypsin inhibitor and modeling of its mutations through structural analyses. *J. Mol. Evol.* **50**: 214-223
- NAKAMURA, K., AND MATSUOKA, K.** (1993) Protein targeting to the vacuole in plant cells. *Plant Physiol.* **101**: 1-5
- NELSON, N.** (1944) A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380
- NEVILLE, D.M.** (1971) Molecular weight determination of protein-dodecylsulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* **246**: 6328-6334
- OHAD, I., FRIEDBERG, I., NEÉMAN, Z., AND SCHRAMM, N.** (1971) Biogenesis and degradation of starch. I. The fate of the amyloplast membranes during maturation and storage of potato tubers. *Plant Physiol.* **47**: 465-477
- PARK, K.S., CHEONG, J.J., LEE, S.J., SUH, M.C., AND CHOI, D.** (2000) A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection. *Biochim. Biophys. Acta* **1492**: 509-512
- PEÑA-CORTES, H., SANCHEZ-SERRANO, J., ROCHA-SOSA, M., AND WILLMITZER, L.** (1988) Systemic induction of proteinase inhibitor II gene expression in potato plants by wounding. *Planta* **174**: 84-89

- PETERSON, G.L.** (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 354-356
- POLLOCK, C.J., AND APREES, T.** (1975) Effect of cold on glucose metabolism by callus and tubers of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **14**: 1903-1906
- PRAT, S., FROMMER, W.B., HÖFGEN, R., KEIL, M., KOßMANN, J., KÖSTER-TÖPFER, M., LIU, X.J., MÜLLER, B., PENA-CORTES, H., ROCHA-SOSA, M., SANCHEZ-SERRANO, J.J., SONNEWALD, U., AND WILLMITZER, L.** (1990) Gene expression during tuber development in potato plants. *FEBS* **268**: 334-338
- PRESSEY, R.** (1966) Separation and properties of potato invertase and invertase inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **113**: 667-674
- PRESSEY, R.** (1967) Invertase inhibitor from potatoes: Purification, characterization, and reactivity with plant invertases. *Plant Physiol.* **42**: 1780-1786
- PRESSEY, R.** (1968) Invertase inhibitors from red beet, sugar beet, and sweet potato roots. *Plant Physiol.* **43**: 1430-1434
- PRESSEY, R.** (1979) Changes in sucrose synthetase and sucrose phosphate synthetase activities during storage of potatoes. *American potato J.* **47**: 245-251
- PRESSEY, R., AND SHAW, R.** (1966) Effect of temperature on invertase, invertase inhibitor, and sugars in potato tubers. *Plant Physiol.* **41**: 1657-1661
- PUTZ, B., UND WEBER, L.** (1991) Schnellmethode zur Bestimmung der reduzierenden Zucker. *Kartoffelbau* **42**: 120-125

- RICHARDSON, M.** (1991) Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods Plant Biochem.* **5**: 259-305
- ROCHA-SOSA, M., SONNEWALD, U., FROMMER, W., STRATMANN, M., SCHELL, J., AND WILLMITZER, L.** (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* **8**: 23-29
- ROSENKRANDS, I., HEJGAARD, J., RASMUSSEN, S.K., AND BJØRN, S.E.** (1994) Serpins from wheat grain. *FEBS Lett.* **343**: 75-80
- RUSCHE, J.R., AND HOWARD-FLANDERS, P.** (1985) Hexamine cobalt chloride promotes intermolecular ligation of blunt end DNA fragments by T4 DNA ligase. *Nucl. Acids Res.* **13**:1997-2008
- RYAN, C.A.** (1981) The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Proteins and nucleic acids Vol. 6, Stumpf, P.K., and Conn, E.E., Academic Press, chapter 9: Proteinase inhibitors: 351-370
- RYAN, C.A.** (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathology* **28**: 425-449
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.G., AND EHRLICH, H.A.** (1988) Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- SAMOTUS, B., NIEDZWIEDZ, M., KOŁODZIEJ, Z., LEJA, M., CZAJKOWSKA, B.** (1974) Storage and reconditioning of tubers of polish potato varieties and strains. I. Influence of storage temperature on sugar level in potato tubers of different varieties and strains. *Potato Res.* **17**: 64-81

- SASAKI, T., TADOKORO, K., AND SUZUKI, S. (1971) Multiple forms of invertase of potato tuber stored at low temperature. *Phytochemistry* **10**: 2047-2050
- SCHNEIDER, A., SALAMINI, F., AND GEBHARDT, C. (1997) Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci21A* of potato. *Plant Physiol.* **113**: 335-345
- SCHWALL, G.P., SAFFORD, R., WESTCOTT, R.J., JEFFCOAT, R., TAYAL, A., SHI, Y.C., GIDLEY, M.J., AND JOBLING, S.A. (2000) Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology* **18**: 551-554
- SCHWIMMER, S., MAKOWER, R.U., AND ROREM, E.S. (1961) Invertase and invertase inhibitor in potato. *Plant Physiol.* **36**: 313-316
- SCHULER, T.H., POPPY, G.M., KERRY, B.R., AND DENHOLM, I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotech.* **16**: 168-175
- SHEWRY, P.R. (1999) Enzyme inhibitors of seeds: types and properties. In: *Seed proteins*, eds. Shewry, P.R., and Casey, R. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam: 587 – 615
- STIEKEMA, W.J., HEIDEKAMP, F., DIRKSE, W.G., VAN BECKUM, J., DE HAAN, P., TEN BOSCH, C., AND LOUWERSE, J.D. (1988) Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **11**: 255-269
- STRICKLAND, J.A., ORR, G.L., WALSH, T.A. (1995) Inhibition of larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. *Plant Physiol* **109**: 667-674
- STRUJELJ, B., PUNGERCAR, J., RITONJA, A., KRIZAJ, I., GUBENSEK, F., KREGAR, I., AND TURK, V. (1990) Nucleotide and deduced amino acid sequence of an aspartic proteinase inhibitor homologue from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) *Nucl. Acids Res.* **18**: 4605

- STRUKELJ, B., RAVNIKAR, M., MESKO, P., POLJSAK-PRIJATELJ, M., PUNGERCAR, J., KOPITAR, G., KREGAR, I., AND TURK, V.** (1995) Molecular cloning and immunocytochemical localization of jasmonic acid inducible cathepsin D inhibitor from potato. *Adv. Exp. Med. Biol.* **362**: 293-298
- STUART, L.S., AND HARRIS, T.H.** (1942) Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein isolated from unbleached wheat flour. *Cereal Chem.* **19**: 288-300
- STURM, A., SEBKOVÁ, V., LORENZ, K., HARDEGGER, M., LIENHARD, S., AND UNGER, C.** (1995) Development- and organ-specific expression of the genes of sucrose synthase and three isoenzymes of acid b-fructofuranosidase in carrot. *Planta* **195**: 601-610
- SUH, S.G., PETERSON, J.E., STIEKEMA, W.J., AND HANNAPEL, D.J.** (1990) Purification and characterization of the 22-kilodalton potato tuber proteins. *Plant Physiol.* **94**: 40-45
- SVENDSEN, I.B., HEJGAARD, J., AND MUNDY, J.** (1986) Complete amino acid sequence of the α -amylase/subtilisin inhibitor from barley. *Carlsberg Research Communications* **51**: 43-50
- THEVISSSEN, K., GHAZI, A., DE SAMBLANX, G.W., BROWNLEE, C., OSBORN, R.W., AND BROEKAERT, W.F.** (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* **271**: 15018-15025
- THEVISSSEN, K., OSBORN, R.W., ACLAND, D.P., AND BROEKAERT, W.F.** (1997) Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **272**: 32176-32181
- THEVISSSEN, K., TERRAS, F.R.G., AND BROEKAERT, W.F.** (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5451-5458

- THEVISSSEN, K., OSBORN, R.W., ACLAND, D.P., AND BROEKART, W.F.** (2000) Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia markii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 54-61
- THORNBURG, R.W., AN, G., CLEVELAND, T.E., JOHNSON, R., AND RYAN, C.A.** (1987) Wound-inducible expression of a potato inhibitor II- chloramphenicol acetyl-transferase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. Acad. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 744-748
- TSAFTARIS, A.S., SORENSON, J.C., AND SCANDALIOS, J.G.** (1980) Glycosylation of catalase inhibitor necessary for activity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **92**: 889-895
- VAN BERKEL, J., SALAMINI, F., AND GEBHARDT, C.** (1994) Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes. *Plant Physiol.* **104**: 445-452
- VAN NOSTRAND, W.E., SCHMAIER, A.H., NEIDITCH, B.R., SIEGEL, R.S., RASCHKE, W.C., SISODA, S.S., AND WAGNER, S.L.** (1994) Expression, purification, and characterization of the Kunitz-type proteinase inhibitor domain of the amyloid b-protein precursor-like protein-2. *Biochim. Biophys. Acta* **1209**: 165-170
- VIGER, A.J., ROBERTS, W.K., AND SELITENNIKOFF, C.P.** (1991) A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* **4**: 315-323
- WALSH, T.A., AND TWITCHELL, W.P.** (1991) Two Kunitz-Type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol.* **97**: 15-18
- WANG, S.M., AND HUANG A.H.C.** (1984) Inhibitors of lipase activities in soybean and other oil seeds. *Plant Physiol.* **76**: 929-934
- WEN, L., HUANG, J.K., ZEN, K.C., JOHNSON, B.H., MUTHUKRISHNAN, S., MACKAY, V., MANNEY, T.R., MANNEY, M., AND REECK, G.R.** (1992) Nucleotide sequence of a

cDNA clone that encodes the maize inhibitor of trypsin and activated Hageman factor. *Plant Mol. Biol.* **18**: 813-814

WENZLER, H.C., MIGNERY, G.A., FISHER, L.M., AND PARK, W.D. (1989) Analysis of a Chimeric class-I patatin-GUS gene in transgenic potato plants; high-level expression in tubers and sucrose-inducible expression in cultured leaf and stem explants. *Plant Mol. Biol.* **17**: 287-288

WESELAKE, R.J., MACGREGOR, A.W., AND HILL, R.D. (1985) Endogenous alpha-amylase inhibitor in various cereals. *Cereal Chem.* **62**: 120-123

YAMAGISHI, K., MITSUMORI, C., AND KIKUTA, Y. (1991) Nucleotide sequence of cDNA encoding the putative trypsin inhibitor in potato tuber. *Plant Mol. Biol.* **17**: 287-288

YANG, H.L., LUO, R.S., WANG, L.X., ZHU, D.X., AND CHI, C.W. (1992) Primary structure and disulfide bridge location of arrowhead double-headed proteinase inhibitors. *J. Biochem.* **79**: 765-773

YOSHIKAWA, M., KIYOHARA, T., ISWASAKI, T., ISHII, Y., AND KIMURA, N. (1979) Amino acid sequences of proteinase inhibitors II and II' from adzuki beans. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 787-796

ZRENNER, R., SCHÜLER, K., AND SONNEWALD, U. (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* **198**: 246-252

8. Verzeichnis der Abkürzungen

d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fließrate [mL/min]
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-etansulfonsäure
His-Tag	Oligohistidin-Tag
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
min	Minute(n)
MPIZ	Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDA	Potato Dextrose Agar
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlauryl-sulfat

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Falle als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Ch. Gebhardt (MPIZ, Köln) betreut worden

Köln, den 17.02.2001

Andreas Heibges

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

HEIBGES, A., BALLVORA, A., SALAMINI, F., AND GEBHARDT, C. (2000) Heterologous Expression of Kunitz-Type Proteinase Inhibitors from Potato Tubers in Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Biotechnology 2000 – The World Congress on Biotechnology, 11th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 3-8, 2000, Berlin.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Züchtungsforschung, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich ein "***Danke Schön***" an folgende Personen richten:

Herrn Prof. Dr. F. Salamini danke ich für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes.

Frau PD Dr. Christiane Gebhardt danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die ständige Bereitschaft zur hilfreichen und anregenden Diskussion.

Dr. Agim Ballvora danke ich für die Diskussionsbereitschaft und das Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Timothy Patrick OConnell danke ich für die Hilfe bei Fragen zum Themengebiet "Hemmung des Wachstums mikrobieller Pilze"

Birgit Walkemeier und Heike Henselewski sowie allen anderen KollegInnen der Abteilung Salamini danke ich für die nette und hilfsbereite Atmosphäre.

Lebenslauf

Persönliches: Andreas Heibges, geb. 07.04.1971 in Würselen bei Aachen als Sohn von Engelbert Heibges und seiner Ehefrau Ingeborg Heibges, geb. Schwarz;
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Aug. 1977 – Jul. 1981 Grundschule Alsdorf-Schaufenberg

Sep. 1981 – Jun. 1990 Gymnasium Alsdorf

Abschluss: Abitur

Bundeswehr:

Jul. 1990 – Jun. 1991 Grundwehrdienst, Lahnstein

Studium:

Okt. 1991 – Aug. 1996 Biologie, RWTH Aachen
Prüfungsfächer: Biotechnologie, Mikrobiologie,
Molekularbiologie, Organische Chemie

Sep. 1996 – Mai 1997 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. W. Hartmeier,
Lehrstuhl für Biotechnologie, RWTH Aachen
Thema: Erweiterung des Substratspektrums eines mikrobiellen
BSB-Sensors durch eine Enzymsäule mit immobilisierter α -
Amylase und Amyloglucosidase.

Sep. 1997 Beginn der Promotion unter Anleitung von PD Dr. Ch. Gebhardt,
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln